

Journal of
Embryology and Experimental
Morphology

VOLUME 4

September 1956

PART 3

PUBLISHED FOR THE COMPANY OF BIOLOGISTS LIMITED

OXFORD : AT THE CLARENDON PRESS

EDITORIAL BOARD

M. ABERCROMBIE (London)	G. V. LOPASHOV (Moscow)
G. R. DE BEER (London)	SIDNIE M. MANTON (London)
J. D. BOYD (Cambridge)	P. B. MEDAWAR (London)
J. BRACHET (Brussels)	D. R. NEWTH (London)
F. W. R. BRAMBELL (Bangor)	J. PASTEELS (Brussels)
H. V. BRØNDSTED (Copenhagen)	CHR. P. RAVEN (Utrecht)
A. M. DALCQ (Brussels)	A. STEFANELLI (Rome)
E. FAURÉ-FREMIET (Paris)	S. TOIVONEN (Helsinki)
HONOR B. FELL (Cambridge)	C. H. WADDINGTON (Edinburgh)
E. HADORN (Zürich)	M. W. WOERDEMAN (Amsterdam)
W. J. HAMILTON (London)	ET. C. WOLFF (Paris)
J. HOLTGRETER (Rochester, N.Y.)	T. YAMADA (Nagoya)
S. HÖRSTADIUS (Uppsala)	J. Z. YOUNG (London)
F. E. LEHMANN (Bern)	S. ZUCKERMAN (Birmingham)

Editor: M. ABERCROMBIE

INFORMATION ABOUT THE JOURNAL

The main object of the Journal is to bring together work concerned with all the kinds of developmental process to be found in animals at any stage of their life-history. It will include work on embryology (descriptive, experimental, chemical, physiological), on regeneration and healing, on the developmental changes involved in functional adaptation, on growth, ageing, and other aspects of late morphogenesis. It will publish studies of gametes and gametogenesis where the work is not primarily of cytological interest; and studies of developmental genetics and of the physiology of reproduction where these fall more within its scope than within the usual scope of existing specialized journals. Papers on those aspects of protozoology which have a bearing on morphogenesis will be acceptable. Papers concerned with developmental processes in plants may be included if they link up with zoological aspects of morphogenesis.

The papers published will for the most part be accounts of finished pieces of research. Preliminary reports will not be published. Theses and very long papers are unlikely to be accepted at present. Theoretical and review papers may be published from time to time, as space allows. Contributions may be English, French, or German. Contributors wishing to use other languages should consult the Editor.

Journal of Embryology and Experimental Morphology is published quarterly. Subscription price £4. 4s. 0d. yearly for the four numbers; for this sum (*prepaid*) the Journal is sent Post Free to any part of the world. Separate numbers price 25s. Correspondence, except that about the subject-matter of the Journal which should be sent to the Editor, should be addressed to the Publisher:

GEOFFREY CUMBERLEGE

OXFORD UNIVERSITY PRESS, AMEN HOUSE, LONDON, E.C.4

The Formation of Sub-blastodermic Fluid in Hens' Eggs

by D. A. T. NEW¹

From the Department of Anatomy and Embryology, University College, London

INTRODUCTION

It is well established that during the first week of incubation of the hen's egg the albumen loses far more water than can be accounted for by evaporation, and at the same time the yolk gains in water (see Needham, 1931, for detailed references). It is apparent, therefore, that water is transferred from the albumen to the yolk. This transferred water does not distribute itself evenly through the yolk, most of it accumulating immediately under the embryo (see Text-fig. 2) and giving rise to the sub-blastodermic fluid (this is the term employed by Murray (1933); Romanoff (1943 *a* and *b*) calls it liquefied yolk).

The sub-blastodermic fluid increases rapidly during early incubation and about 16 g. is present at the end of the first week; it then decreases in amount whilst the amniotic and allantoic fluids are forming and has almost disappeared by the end of the second week (Romanoff, 1943*a*). Until about the 9th day of incubation more than 90 per cent. of the sub-blastodermic fluid consists of water (Romanoff, 1943*b*).

Osmotic forces between yolk and albumen have sometimes been considered sufficient explanation of the mechanism governing this fluid formation (e.g. Yamada, 1933). Subsidiary mechanisms may also be present. Wladimiroff (1926) concluded from pH measurements that acid was released in the albumen, which, he argued, would bring the proteins closer to their isoelectric point and would therefore reduce their power of holding water.

It is the aim of this paper to show that whether or not such forces exist in the non-protoplasmic parts of the egg, a large part of the sub-blastodermic fluid is probably formed directly as a result of a secretory activity of the blastoderm.

METHOD

Blastoderms were grown *in vitro* by a method described in an earlier publication (New, 1955). Each blastoderm is grown on a piece of vitelline membrane stretched across a glass ring in a watch glass (Text-fig. 1A). Under the vitelline

¹ *Author's address:* Department of Anatomy and Embryology, University College, London, Gower St., W.C.1, U.K.

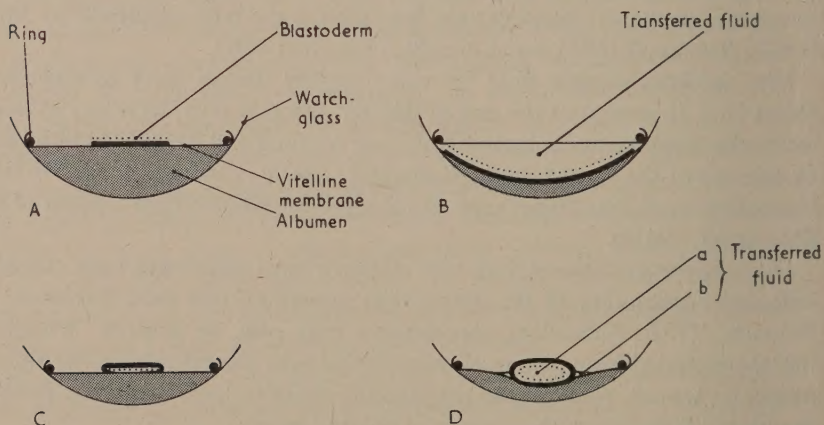
membrane is placed a little thin albumen. There is no yolk in this system other than a small amount ingested within the endoderm cells of the area opaca. If, therefore, any fluid is removed from the albumen and passed through the vitelline membrane and blastoderm, the forces controlling this transfer must be independent of osmotic or other forces between yolk and albumen.

The experiments fall into two groups, those in which the blastoderms were explanted ectoderm surface downwards (i.e. against the vitelline membrane) and those in which the blastoderms were explanted endoderm surface downwards. The quantities of transferred fluid in the first group of experiments were determined with a small measuring cylinder and are therefore given as volumes. In the second group, for greater accuracy, the quantities were determined by weighing the preparations before and after removal of the fluid.

RESULTS

Explantation ectoderm downwards

Forty-five cultures of this type were made. These cultures contained blastoderms explanted at various stages between 24 and 48 hours of incubation. Explan-



TEXT-FIG. 1. A and B. Blastoderm explanted ectoderm downwards. A. Condition at the time of explantation. B. Condition after a total incubation time of 48 hours. C and D. Blastoderm explanted endoderm downwards. C. The edges curl under. D. Closed vesicle formed: the transferred fluid is mostly within the vesicle (a), though some is outside it (b). Ectoderm shown as a continuous thick line, endoderm as a dotted line.

sion of the blastoderm continued *in vitro* until the whole available area of vitelline membrane (about 28 mm. diam.) was covered (Text-fig. 1B); this occurred soon after 48 hours of total incubation time. The cultures were examined 2 or 3 days after explantation and frequently fluid was found to have accumulated above the blastoderm. This was pipetted off and measured. In those cases where

the blastoderm died particularly early the volume of fluid obtained was usually very small. When development continued to 25 somites or more, however, considerable quantities of fluid appeared. The average value from 30 such blastoderms was 0.75 c.c. with a maximum of 1.4 c.c.

In order to be certain that this fluid was not just albumen that had seeped through damaged parts of the vitelline membrane, a quantity of it was collected from several cultures and boiled in a test-tube. It behaved exactly like sub-blastodermic fluid and quite unlike albumen. A loose floccular precipitate formed, which gradually settled into the bottom of the test-tube leaving a clear fluid above. Albumen treated in the same way forms a rigid mass.

But there can be no doubt that although this fluid is not albumen, it has arisen from the albumen. Each culture was initially supplied with 1–2 c.c. of albumen below the vitelline membrane. If no fluid formation occurs a similar quantity of albumen can be recovered after a few days' incubation. When fluid is formed above the blastoderm, however, the volume of albumen remaining drops to low values. Instances have been common in which over 0.8 c.c. of fluid has been obtained above the blastoderm whilst less than 0.5 c.c. of albumen was left.

The absence of 'free' yolk in these preparations excludes the possibility of forces between the yolk and albumen being the cause of the fluid formation. They suggest, on the contrary, that the fluid is produced as a result of secretion by the blastoderm. As a check on this interpretation eight controls were set up in which the blastoderm was removed; in four of them the blastoderm was replaced by a drop of yolk. After 2 to 3 days of incubation none of these controls showed more than negligible quantities (< 0.1 c.c.) of fluid above the vitelline membrane.

There remains the possibility, however, that the weight of the blastoderm and vitelline membrane might set up a pressure, itself sufficient to force fluid out of the albumen and into a position above the blastoderm. It was found that when blastoderms at their maximum stage of development *in vitro* were replaced by small glass rods of two to three times the weight, small quantities of fluid (up to 0.25 c.c.) appeared above the vitelline membrane after a further 2 days' incubation. Although these quantities are much smaller than those found when a blastoderm is present they are sufficient to raise doubts as to whether or not the blastoderm is secreting. However, the experiments described in the next section have removed this uncertainty.

Explantation endoderm downwards

The chick blastoderm normally expands with its ectoderm surface applied to the vitelline membrane. In making these preparations, therefore, the blastoderm had to be separated from the vitelline membrane and then inverted on it. Under such conditions it does not expand normally, but instead the edges curl under, bringing their ectoderm surface again in contact with the vitelline membrane

(Text-fig. 1c). Expansion then occurs, but from the geometry of the system the edges are now forced to grow inwards instead of outwards. Eventually they meet, fuse, and convert the blastoderm into a hollow vesicle (Text-fig. 1d).

When cultures of this kind were incubated for 2 or 3 days each blastodermic vesicle appeared as though 'blown up' from within, and if punctured a quantity of fluid flowed out of it. This was observed in 27 cultures, the maximum quantity of fluid recovered from a single vesicle being 0.69 g. This fluid reacted to boiling in the same way as sub-blastodermic fluid: it separated into a small precipitate with clear fluid above. Only very small quantities of fluid were found above the vitelline membrane outside the blastodermic vesicle. Details of measurements

TABLE 1

	Culture No.			
	1	2	3	4
Stage of embryo at explantation	Primitive Strk.	Head Fold	3 somites	7 somites
Hrs. incubated <i>in vitro</i>	47	41	51	49.5
Initial weight of albumen, g.	1.92	2.05	1.57	1.41
Final weight of albumen, g.	1.65	1.52	0.43	0.50
Loss of weight of albumen, g.	0.27	0.53	1.14	0.91
Fluid recovered from inside vesicle (a in Fig. 1d), g.	0.12	0.34	0.69	0.55
Fluid recovered from outside vesicle (b in Fig. 1d), g.	0.09	0.08	0.25	0.12
Total fluid recovered, g.	0.21	0.42	0.94	0.67

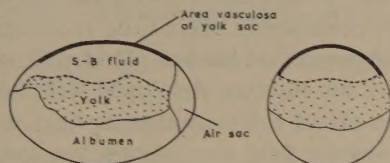
made on four of these cultures are shown in Table 1. It can be seen that the loss in weight of the albumen increases almost proportionately with the amount of fluid formed, leaving little doubt that the fluid is formed from albumen. The greater part of the fluid formed in each case was recovered from within the blastodermic vesicle. (As might be expected the loss in weight of the albumen is in fact greater than the weight of fluid formed since small quantities of material are consumed by the developing embryo.)

The most likely explanation for the accumulation of fluid within these blastodermic vesicles is that the blastoderm actively absorbs fluid on its ectoderm surface and secretes it from its endoderm surface. Alternative explanations involving fluid formation as a result of the weight of the blastoderm or vitelline membrane (as might have been possible when the blastoderms were explanted ectoderm surface downwards) are here avoided since they would be inadequate to account for the appearance of fluid *inside* the vesicles.

DISCUSSION

The experiments that have been described strongly suggest that the blastoderm has the ability during early incubation to remove fluid from the albumen and to secrete fluid from its endoderm surface. Just how far this secretory property is responsible for sub-blastodermic fluid formation *in ovo* is an open ques-

tion. Table 1 suggests that at least 60 per cent. of the albumen can be secreted as fluid—a figure high enough to account for the whole of the fluid formed *in ovo*. However, the present work has not excluded the possibility that in the egg other mechanisms (e.g. osmotic) may also operate, and the safest conclusion would seem to be that since the blastoderm exhibits secretory activity so markedly *in vitro*, it is highly probable that this activity accounts for at least a major part of the fluid formed *in ovo*.



TEXT-FIG. 2. Sagittal and transverse sections of an egg incubated 4 days (yolk and albumen fixed by boiling). At this stage the blastoderm encloses the sub-blastodermic (S-B) fluid and most of the yolk.

Why is the sub-blastodermic fluid formed at all? The transfer of such a large volume of fluid—nearly one-third of the whole egg contents—is a remarkable achievement at a time when the amount of living matter in the egg is relatively small.

Probably the most important function of the sub-blastodermic fluid is to assist respiration. It follows from the facts that the fluid is lighter than albumen, is formed from albumen, and increases the contents of the yolk sac, that a large area of chorion and yolk sac must reach a position very close to the shell membranes (Text-fig. 2). This means that the area vasculosa of the yolk sac, in addition to having a nutritive function, is also in a position greatly to assist respiration at a time when the allantois is still small or undeveloped. Furthermore, when the allantois does develop, it finds the chorion immediately under the shell membranes (the vitelline membrane having broken down after the 4th day) and the vascular chorio-allantoic membrane is established as close as possible to the source of oxygen.

The fact that the sub-blastodermic fluid is of lower density than the yolk is probably itself a feature of some value. It is known that eggs require turning over from time to time during incubation, otherwise the percentage hatchability is greatly reduced (Eycleshymer, 1907, and others). The division of the yolk sac contents into lighter sub-blastodermic fluid and heavier yolk means that they come under a turning couple as soon as the egg is rotated to a new position. As a result, both constituents return to their former position carrying with them the blastoderm. (At the start of incubation the yolk itself seems to be polarized and returns to its former position when the egg is turned.) The whole mechanism probably serves to break down harmful adhesions which might otherwise occur (Dareste, 1891; Eycleshymer, 1907).

Finally it may be suggested that the sub-blastodermic fluid provides a better environment for the developing embryo than the yolk. It is known that the chick embryo excretes quantities of ammonia and urea during the first half of incubation (see Needham, 1931, p. 1089). Since the yolk appears to be highly resistant to diffusion of substances through it (Maurice, 1952; Maurice & Fidanza, 1952) a yolky environment might create a dangerous concentration of these substances close to the embryo; little is known of the chemistry of the sub-blastodermic fluid but during the first week of incubation it contains about 95 per cent. water (Romanoff, 1943*b*) and presumably offers little resistance to diffusion. Work by Spratt (1947) has suggested that the low pH of yolk (4.5–6.0) is harmful to embryonic development: his embryos developed well, however, when the pH was raised to 7.5. The pH of sub-blastodermic fluid is 7.7 (Shklyar, 1937). Possibly the sub-blastodermic fluid even creates less mechanical resistance to development than the denser yolk.

SUMMARY

1. Chick blastoderms have been grown *in vitro* on pieces of vitelline membrane supported over albumen.
2. The blastoderms were found to remove fluid from the albumen and to secrete it from their endodermal surfaces.
3. It is concluded that this could be the mechanism by which the sub-blastodermic fluid is formed *in ovo*.
4. The importance of the sub-blastodermic fluid to the developing embryo is discussed.

ACKNOWLEDGEMENTS

I should like to thank Mr. M. Abercrombie for the very helpful advice and criticism he has given me during the course of this work. I am also grateful to Miss D. Isenstein for technical assistance and to the Agricultural Research Council for financial support.

REFERENCES

- DARESTE, C. (1891). *Recherches sur la production artificielle des monstruosités ou essais de tératogénie expérimentale*. 2nd ed., Paris.
- EYCLESHYMER, A. C. (1907). Some observations and experiments on the natural and artificial incubation of the egg of the common fowl. *Biol. Bull.* **12**, 360–74.
- MAURICE, D. M. (1952). Electrical resistance and structure of the hen's egg. *Nature, Lond.* **170**, 495.
- & FIDANZA, A. (1952). Permeability of yolk of the hen's egg to bromine-82. *Nature, Lond.* **170**, 546.
- MURRAY, P. D. F. (1933). The cultivation in saline and other media of the haematopoietic region of the early chick embryo. *Arch. exp. Zellforsch.* **14**, 574–94.
- NEEDHAM, J. (1931). *Chemical Embryology*. Cambridge: The University Press.
- NEW, D. A. T. (1955). A new technique for the cultivation of the chick embryo *in vitro*. *J. Embryol. exp. Morph.* **3**, 326–31.

- ROMANOFF, A. L. (1943a). Assimilation of avian yolk and albumen under normal and extreme incubating temperatures. *Anat. Rec.* **86**, 143-8.
- (1943b). Distribution of dry constituents of yolk and albumen in the developing avian egg. *Anat. Rec.* **87**, 303-6.
- SHKLYAR, N. (1937). A study of physico-chemical changes in the egg during embryonic development in birds. I. Changes in the concentration of H ions in relation to embryonic development in the eggs of domestic fowl (hens, turkeys, ducks, geese). *Ukr. biochem. J.* **10**, 405-6.
- SPRATT, N. T. Jr. (1947). Development *in vitro* of the early chick blastoderm explanted on yolk and albumen extract saline-agar substrate. *J. exp. Zool.* **106**, 345-65.
- WLADIMIROFF, G. E. (1926). Beiträge zur Embryochemie und Embryophysiologie. I. Mitteilung: Einige physikalisch-chemische Veränderungen des Eierweißes sich entwickelnder Hühnereier. *Biochem. Z.* **177**, 280-97.
- YAMADA, K. (1933). Über die Verteilung von Chlor in sich entwickelnder Hühnereiern. *Jap. J. med. Sci. II. Biochemistry*, **2**, 71-79.

(Manuscript received 13:x:55)

Developmental Interactions in the Development of the Imaginal Muscles of *Drosophila*

by H. H. EL SHATOURY¹

From the Institute of Animal Genetics, Edinburgh

WITH THREE PLATES

INTRODUCTION

THE thorax of *Drosophila*, which is made up in the main by the mesothorax, contains two main groups of muscles. There is a dorsal set composed of six pairs of fibrillar muscles (Plate 1, fig. 1). The lateral set of each side (Plate 1, fig. 2) comprises three tergo-sternal, two tergal removers of the coxa, two dorsal oblique lateral muscles, and three trochanteral depressors of the three legs, of which the second (mesothoracic) is the largest. All these muscles with the exception of the trochanteral depressors are indirect flight-muscles and take an active part in the mechanism of flight. All, with the same exception, are fibrillar in structure. The trochanteral depressors have a structure which is referred to as tubular and are probably concerned with the movement of the legs.

The present investigation deals with the development of these muscles in the wild type both under normal circumstances and following certain surgical operations, and also in flies which exhibit the bithorax phenotype in which the meta-thoracic region has become converted into a secondary mesothorax. Evidence will be given that the mesothoracic depressor induces the final differentiation and growth of the fibrillar muscles of the thorax.

MATERIAL AND METHODS

Larvae and pupae were fixed at 5-hour intervals from the late third instar stage until shortly before the imago hatch. Hot fixatives were used (Bouin or even hot water). The wild type material was embedded through 90 per cent. alcohol and amyl acetate, then sectioned at 5 μ and stained with Mayer's haemalum with eosin as counterstain. The bithorax material was embedded through butyl alcohol and liquid phenol, sectioned at 10 μ and stained with Mallory. The bithorax phenotypes were taken from an 'assimilated bithorax' stock developed by Waddington (1953); this gives almost 100 per cent. of extreme bithorax individuals when treated by ether vapour in the early embryonic stage. Surgical

¹ Author's address: Department of Zoology, Faculty of Science, Alexandria University, Egypt.
[J. Embryol. exp. Morph. Vol. 4, Part 3, pp. 228-239, September 1956]

removal of certain imaginal buds was carried out in the usual way on etherized third instar larvae using fine watchmaker's forceps.

RESULTS

In the late third instar larva the future thoracic region contains two main groups of imaginal buds. On each side there is a dorso-lateral set consisting of a dorsal mesothoracic (wing) bud, a dorsal metathoracic (halter) bud, and a ventral metathoracic (third leg) bud. The ventro-lateral group contains the ventral prothoracic and ventral mesothoracic buds which form the first and second legs respectively. Shortly before pupation (96 hours) each of these imaginal buds has already differentiated into two portions; the folded distal segment which metamorphoses to the corresponding appendage and the flat proximal segment which contributes to the thoracic integument. The mesodermal component of each of the buds is unequally distributed between the two segments. Under the folded segment it forms a thin layer of differentiated spindle-shaped cells, the thickness of the layer varying in a pattern which fits in with the folding of the overlying epithelium (Shatoury, 1955). Underneath the presumptive thoracic segments the mesoderm cells are more closely aggregated and the thickness of the layer is more uniform. It is this mesoderm underlying the proximal segment of the bud which represents the imaginal primordia (myocytes) of the muscles of the thorax. The mesoderm associated with the distal segment forms the muscles which lie inside the appendages.

At the beginning of the white puparium stage the imaginal epidermis of the ventral region of the thorax, arising from the leg buds, is separate from the dorsal thoracic hypodermis which is formed in the main from the mesothoracic bud, but these two regions fuse before the end of the prepupal stage. In the early pupa, therefore, the thoracic integument is complete. If a pupa of this stage is observed from the side, it will be seen that there is very little curvature of the profile of the dorsal mid-line as it runs from anterior to posterior. The main region of the thorax is marked off from the cephalic hypodermis in front only by a shallow depression, to which is attached a thin fold which represents the future notum of the prothorax; and posteriorly it is joined to the hypodermis of the abdomen by a very short segment derived from the haltere bud. In between these two points the profile of the thorax is flat. We shall consider later the processes which bring about the differentiation of the mesothorax into the curved scutum, scutellum and mesothoracic post-notum.

The formation of the dorso-median muscles

When the wing bud everts, the mesoderm of the future thoracic segment becomes situated underneath the thoracic integument to which the latter has metamorphosed. In this region there are three pairs of dorsal larval muscles which are similar to the other larval muscles of the abdomen and cephalon in

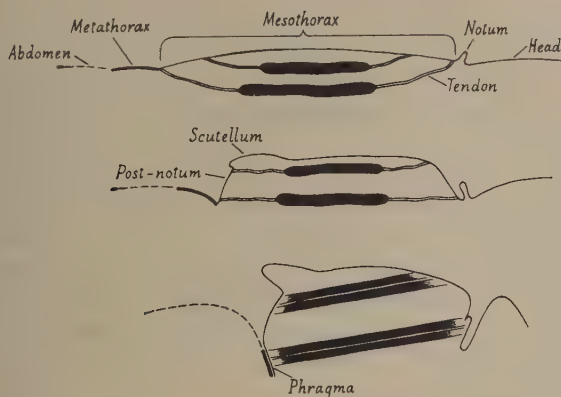
being eosinophilic and in showing longitudinal and cross-striations and large peripheral nuclei. In 6-hour-old prepupae the mesoderm cells surround and completely enclose these three pairs of muscles (Plate 1, fig. 3). By the first few hours of pupal life most of the mesoderm cells have become rather flattened and spindle-shaped and have penetrated deeply into the larval muscles (Plate 1, fig. 4). Some of the cells, however, migrate anteriorly and posteriorly and form long strands which connect the muscles to the anterior and posterior extremities of the mesothorax. These strands represent the rudiments of the tendons (Plate 1, fig. 4). By the time the pupa has reached the age of 5 hours the anterior and posterior tendons have already contracted slightly. This causes some local curvature of the thoracic integument and begins to mark off the head from the thorax and the latter from the abdomen.

Up to 20 hours after puparium formation the dorsal median muscles are represented only by the three larval pairs, the myocytes of which show symptoms of degeneration and appear vacuolated. Sections of pupae taken 10 hours later show a large number of migrating mesoderm cells in the region of the dorsal muscles. These must arise from somewhere in the thorax, and their histological appearance, as well as experimental results to be reported later, suggests that they are in fact derived from the mesothoracic depressor which is formed from the second leg bud. On each side these migrating cells penetrate the three dorsal muscles and split each muscle longitudinally into two equal components. It is as a consequence of this process that there are six indirect flight-muscles on each side of the imago in place of the three which are characteristic of the larva. Plate 1, fig. 5 shows a set of these muscles from one side of the body and illustrates the extensive migration from the adjacent depressor and the splitting of the larval muscles.

At a slightly more advanced stage of differentiation the migrating cells penetrate the muscles completely and arrange themselves in parallel longitudinal strands (Plate 1, fig. 6). Much later in development, after imaginal differentiation of the fibrillar muscles has been completed, transverse sections show that the parallel rows of myocytes have subdivided each individual muscle into bundles which are polygonal in cross-section. In longitudinal sections of the whole thorax, the dorsal muscles of each side are parallel to one another and to the dorsal hypodermis (Plate 2, fig. 9). Their size tends to increase gradually from the most dorsal to the most ventral, and they are held in position by the thick strands of the anterior and posterior tendons.

The anterior tendons of the uppermost pair of muscle are attached to the thoracic hypodermis in the region just posterior to the curved anterior thoracic region, while those of the lowest pair are attached to the extreme anterior end of the mesothorax. The posterior tendons of the uppermost muscles are fixed to the hypodermis just posterior to the future scutellum and those of the lowest muscles to the extreme posterior end of the mesothorax. While the differentiation of the muscle is still proceeding, some contraction of these tendons occurs, causing a

slight downward curvature of the parts of the thoracic integument to which they are attached. At about 40 hours after puparium formation, both the anterior and posterior tendons contract considerably, to less than a quarter of their original length. This causes both their anterior and posterior attachments to be bent sharply inwards. Posteriorly this leads to the conspicuous differentiation of the post-notum which is illustrated diagrammatically in Text-fig. 1. The contraction continues in later stages and in 70-hour pupae (or 82 hours after puparium formation) the tendons have become very short and thick; in this condition they are generally referred to as tonofibrillae (Plate 1, fig. 1). By this time the anterior part of the mesothorax is bent at quite a sharp angle, while at the posterior end the post-notum has been pulled forward so much that it becomes practically concealed under the scutellum.



TEXT-FIG. 1. A diagrammatic representation illustrating (above) the contraction of the tendons of the dorsal median muscles; (middle) the differentiation of the mesothorax into the main body of the scutum, the scutellum and the post-notum; and (below) the metathoracic derivative of the thorax.

From this description it is seen that the post-notum is developed from the posterior part of the mesothoracic integument and marks the region to which the posterior tendons of the dorsal flight-muscles are connected. This conclusion is in agreement with Snodgrass (1935) and contradicts certain other workers who believe that the post-notum represents the notum of the metathorax.

Our studies on the development of the haltere buds indicate that they contribute to the thoracic integument with a small segment which in early pupal stages is distinguishable from the mesothoracic contribution and which lies just posterior to the future post-notum (Text-fig. 1). Following the contraction of the dorsal flight-muscles and the differentiation of the post-notum, this segment is pulled inwards and forms the posterior wall of the phragma which separates the thorax from the abdomen. This agrees with Ferris (1943) and Snodgrass (1935).

Formation of the lateral fibrillar muscles

In addition to the three pairs of larval dorsal muscles, which form the substrate of the dorsal flight-muscles of the adult, there are also three pairs of lateral larval muscles which develop in a similar way to form the lateral fibrillar muscles of the imago. On each side two of the lateral larval muscles become duplicated to form the tergal remoters and the dorsal oblique lateral muscles. The third larval muscle is split into three parts to form the tergosternal remoters. The main bulk of the final lateral fibrillar muscles, like that of the dorsal flight-muscles, is formed from the mesoderm cells of the presumptive thoracic region of the wing bud.

Formation of the tubular muscles

The mesothoracic depressor is the largest tubular muscle and the following description is based largely on the study of its development.

The ends of the skeletal muscles of the fibrillar type are attached to the hypodermis through intermediary tonofibrillae which, in the adult, are very short. The trochanteral depressor, although attached dorsally through ordinary tonofibrillae, is fixed ventrally to a long chitinous process which extends inwards from the cuticle. It is this ventral chitinous process which is the first element in the muscle to be formed during development. When the second leg bud everts some mesoderm cells, which lie under the future trochanter, arrange themselves in a short strand which becomes attached to the trochanteral integument. Shortly after this they contract and cause invagination of a region of the hypodermis to form a narrow process which extends upwards into the body cavity. This hypodermal process becomes lined with chitin and serves as a stalk on the top of which the actual muscle is formed.

In the development of the tubular muscles in general no substrate of larval muscle appears to be necessary, the imaginal tissues being formed directly from myocytes derived from the sternal region of the imaginal buds. By 20 hours after puparium formation these myocytes have increased in size and undergone considerable proliferation, forming a group of cells which extends dorsally. Five hours later the future muscle appears as a dense aggregate of undifferentiated cells. From about 27 hours after puparium formation and onwards these aggregates begin to differentiate in a peculiar manner which can be summarized as follows.

At first the outermost cells of the more or less cylindrical mass differentiate into a network of muscle-fibres. The future muscle at this stage presents the appearance of a continuous muscular sheath enveloping the mass of undifferentiated myocytes (Plate 2, fig. 8). In transverse section it can be seen that the sheath is a one layered epithelium of mono-nucleated cells. At this stage the inner core of the future muscle is still open at the dorsal side where it lies close against the dorsal median muscles of each side (Plate 2, fig. 8). The differentiation of the depressors seems then to remain stationary for a few hours and it is during this

time that it seems probable that some of the myocytes escape through the open dorsal end of the muscle and migrate to the dorsal fibrillar muscles as mentioned above. Later the differentiation of the remaining myocytes and muscle-fibres continues. This process progresses from the outside of the mass towards the middle so that the originally thin muscular sheath gradually increases in thickness. By 50 hours after puparium formation the formation of muscle-fibres is completed and the supply of myocytes in the centre of the mass is almost exhausted. Transverse section (Plate 2, fig. 7) shows that the muscle is composed of lamellae, each several fibres thick, and that there are a few remnants of undifferentiated myocytes still remaining in the centre.

The other tubular muscles of the thorax, including the direct flight-muscles, are developed in a similar way.

Extirpation of leg buds from late third instar larvae

Only certain aspects of these experiments, relevant to the present theme, will be considered here.

When the second leg bud is removed from one side of a late third instar larva, the second leg on this side is missing from the fully developed imago, which usually have to be dissected out from the puparium. As is illustrated in Plate 2, fig. 10, the first leg on the operated side shifts backwards while the third leg on the same side moves forwards. This displacement of the two legs covers completely the area which is normally occupied by the extirpated bud. The movement gives rise to some asymmetry of both the first and third pair of legs, particularly of the latter. The forward movement of the third leg may in fact be so large that it gives at first sight a false impression that it is the third leg which is missing. However, the bristle pattern and other characteristics of the displaced legs remain completely unchanged.

When first leg buds are being removed, it is better to operate on male larvae since the presence of the sex comb eliminates any confusion as to which bud has been removed. Following a successful operation the second leg on the operated side moves forward so as to lie more or less midway between the positions of the first and second legs on the other side. The third leg also shifts anteriorly and this again may give rise to the misleading impression that it is the third leg which has been extirpated.

When either the first or the third leg buds were removed, histological examination of the pupal thorax showed a deficiency of the trochantal depressor which should normally be formed from the mesoderm of the missing bud. No other abnormalities of the muscular system could be found.

When a second leg bud is extirpated the results are more far-reaching. The operation is normally done on one side only so that the other side can serve as control. Investigation of three fully developed pupae showed that the operated side not only lacked the mesothoracic depressor, but that there were also deficiencies in the dorsal and lateral sets of fibrillar muscles. In the transverse section

shown in Plate 2, fig. 11, compared to control, Plate 2, fig. 12, it is clear that the operated side is devoid of the imaginal dorsal muscles. Plate 3, fig. 13, which is cut in the frontal plane, illustrates the absence of the lateral set of muscles; the trochanteral depressors of the first and third legs are unaffected by the operation. It is important to note, as shown in Plate 2, fig. 11, that the larval dorsal and lateral muscles on the operated side, which normally form the substrate of the imaginal muscles, do not histolyse but remain comparatively undamaged even in the hatched imago.

Histological examination of earlier stages of similarly operated individuals shows that the histological differentiation of the muscles proceeds quite normally until the stage at which the larval muscular cells become vacuolated. The next stage, in which the muscles are split longitudinally by migrating cells, fails to occur and the muscles retain the single configuration which they had in the larva. No further histological differentiation takes place within the muscle. There is, however, sometimes some sign of further growth. The situation illustrated in Plate 2, fig. 11, which represents an extreme case of growth inhibition, is the condition most commonly found. However, although in none of the specimens examined did the larval muscles become split or the histological differentiation proceed to completion, a few pupae showed that the muscles had become quite large, with functional tendons which acted in the normal way in the differentiation of the post-notum and the elevation of the scutellum.

The thoracic muscles in bithorax phenotypes

In a stock which was producing a large percentage of high grade bithorax phenotypes, haltere buds dissected out from third instar larvae showed various degrees of hypertrophy. Some were as large as wing buds and showed a similar pattern of folding (Plate 3, fig. 14). In other cases only the thoracic portion was hypertrophied. Or again, the enlargement might affect mainly the wing portion of the disk. These variations in the imaginal buds correspond to different types of expression of the phenotype in the adult animals.

In adults in which the metathoracic bud has been transformed into a mesothorax, this structure lies in a region which was originally provided with larval muscles very similar in type to those of the main thoracic region. It might be expected that the mesoderm of the transformed metathoracic bud would form another set of imaginal muscles by interacting with these larval muscles in its neighbourhood. Investigation of a large number of such flies shows that there is a normal set of muscles in the thorax proper, except that the trochanteral depressor of the third leg and the accessory attachments have become associated with the secondary mesothorax. In this secondary mesothorax, however, neither the dorsal flight-muscle nor the lateral group of fibrillar muscles are present (Plate 3, fig. 15). The cavity of the extra thorax is, for the most part, filled with fat bodies similar to those occurring in the abdominal cavity. Sometimes, however, small and badly individualized groups of muscular tissue can be found. In

early pupal stages there is sometimes an abnormal dorsal muscle which probably arises from the interaction of the mesoderm cells of the hypertrophied imaginal bud with the already existing larval muscles.

In later stages, however, the mesoderm cells show symptoms of degeneration and appear strongly pycnotic (Plate 3, fig. 16). The muscle never develops the histological characteristics found in the normal adult. There are also sometimes small representatives of the lateral group of fibrillar muscles. A considerable number of specimens showed a small tergo-sternal muscle on each side of the thorax (Plate 3, fig. 17), but the histological appearance was abnormal, the nuclei becoming partially broken down.

The normal thorax of *Drosophila* is provided with two pairs of spiracles, an anterior mesothoracic pair which lies between the propleura and mesopleura and a posterior metathoracic pair lying between the bases of the halteres and the hypopleura. In typical bithorax flies the metathoracic spiracles have shifted so as to lie in the second thorax in the position corresponding to that of the normal mesothoracic pair. In this position they would receive a muscular supply from the adjacent trochanteral depressor of the third leg (Plate 3, fig. 18).

In bithorax flies in which the metathoracic disk has hypertrophied so as to produce a complete extra thorax provided with scutellum, it is noteworthy that this second scutellum had no post-notum. This is what we should expect in the absence of dorsal flight-muscles within it, since, as has been shown above, it is a contraction of the tendons attached to these muscles which pulls part of the thoracic integument inwards to form the post-notum.

It is not easy to be quite certain why fibrillar muscles fail to appear in the extra thorax of most bithorax flies. One might at first be tempted to argue that the bithorax action had affected only the dorsal metathoracic bud and had left the bud of the third leg unaffected, so that it does not produce the migrating myocytes which pass from the rudiment of the second trochanteral depressor into the differentiating dorsal and lateral fibrillar muscles. However, this does not seem very likely to be the whole story. In the first place, examination of extreme bithorax individuals shows that their third legs have acquired the patterns of bristles and hairs characteristic of normal second legs. They are therefore definitely affected by the bithorax action, although very little change in their volume seems to occur. There is also some experimental evidence. If a wing bud is extirpated from one side of a late third instar bithorax larva, the metathoracic bud on that side frequently shifts forward into the position of the missing part of the mesothorax. It may either remain quite separate from the mesothoracic bud of the other side, or it may fuse with it to form part of an almost normal thorax (Waddington, 1953; Pantelouris & Waddington, 1955). In two such pupae in which there was a failure of fusion, the anteriorly displaced metathoracic derivative contained dorsal and lateral muscles which had not developed beyond the stage which is reached when a second leg bud is extirpated (the transverse section therefore appears similar to that shown in Plate 2, fig. 11). In these two indivi-

duals migrating myocytes from the second leg bud should have been able to co-operate with the mesoderm of the metathoracic bud to produce full differentiation of the imaginal muscles. A similar failure of the muscles has been found to occur in some bithorax individuals in which, following the removal of one wing bud, the mesothoracic bud on that side has shifted forward and fused with the mesothoracic bud of the other side, in the manner described by Pantelouris & Waddington. In some individuals of this type, however, the displaced metathoracic bud contains a completely normal set of adult muscles. It has not been possible to obtain a sufficient number of such flies for a study to be made of the various stages in their development, but it seems certain that the imaginal muscles must have arisen from the combined action of the mesoderm cells from the metathoracic bud and migrating myocytes from the normal mesothoracic trochanteral depressor. There is, therefore, little doubt that the bithorax action not only transforms the hypodermal portion of the metathoracic bud so that it develops into a mesothorax, but that it also endows the metathoracic mesoderm with the capacity to differentiate into fibrillar muscles. It is, however, only rarely that this development is satisfactorily achieved and it may be that the mesodermal component of the metathoracic bud is less easily transformed to a mesothoracic state than the hyperdermal component. To complete the picture one would like to have information as to whether the third leg bud of a bithorax individual could provide from its trochanteral depressor the migrating myocytes which could exert the functions which normally are fulfilled by cells of this kind coming from the mesothoracic depressor. This could perhaps be obtained by removing a second leg bud, or if necessary both the second leg bud and the metathoracic dorsal bud, from a bithorax larva. Such operations have, however, not yet been carried out.

DISCUSSION

The histological examination of the developing fibrillar muscles shows that they receive a considerable influx of cells at about 30 hours after puparium formation, and it suggests that these cells come from the trochanteral depressors of the second legs. The results of the experiments in which the second leg buds were extirpated clearly confirm this suggestion. Moreover, in the absence of the second leg bud the dorsal muscles do not continue to develop so as to form tissues which are deficient only in the cells which should have migrated to them. On the contrary they almost entirely cease from further development. The migrating myocytes from the depressors do not, therefore, merely add to the developing dorsal muscles, but may in some sense be said to induce the further course of differentiation. The induction is perhaps not very closely comparable to the classical phenomena so well known in the experimental embryology of vertebrates, since there is no evidence that the depressors determine which of a number of alternatives the remainder of the dorsal muscular tissues shall follow. Their action is to enable differentiation to proceed rather than to determine in

which direction it shall go. It would therefore perhaps be inappropriate to speak of them as 'inducers' of muscular differentiation, but one can legitimately say that there is some kind of inductive relation between them and the other components of the fibrillar muscles.

When a second leg is removed from one side the failure of fibrillar muscles on that side to put in an appearance is evidence that the trochanteral depressor of the other side cannot take over the inductive functions of the bud which has been extirpated. The same argument shows that the first and third leg disks on the same side can also not substitute adequately for the extirpated second leg buds. In the latter case it may well be that the first and third legs differ in their biological effectiveness from the second leg and do not share with it the inductive property, whatever that may be. On the other hand, it seems possible that in all these cases the failure to act as an efficient substitute for the extirpated second bud is due to a quantitative rather than a qualitative lack. The depressor of the second leg is much larger than either that of the first or third, and it may be that the two latter cannot provide sufficiently migratory cells. Again, the second trochanteral depressor of the other side may be too far away to produce an adequate number of migrating cells to allow the differentiation of the fibrillar muscles to proceed to completion.

SUMMARY

1. The thorax of *Drosophila* contains two main sets of muscles, the dorsal flight-muscles and a lateral set. Among the latter are the trochanteral depressors of the legs, of which those associated with the second legs are the largest. The development of all these muscles during the pupal period is described and an account is given of the effects of the contraction of the tendons of the longitudinal muscles in producing the curvature of the mesothorax and the formation of the post-notum.

2. The dorsal flight-muscles develop from an interaction between (a) three pairs of larval muscles; (b) mesoderm cells derived from the mesothoracic imaginal buds; (c) cells which migrate from the developing trochanteral depressors of the second leg. It is the latter cells which are responsible for splitting the three larval muscles of each side into six. The fibrillar muscles of the lateral set have a similar origin.

3. The trochanteral depressors are tubular, not fibrillar, in structure. They are formed from mesoderm cells of the leg imaginal buds.

4. If the imaginal bud of a first or third leg is removed from the late larva, not only the leg but also the corresponding trochanteral depressor is missing from the adult. If a second leg bud is removed, the dorsal flight-muscles and the lateral fibrillar muscles on that side also fail to develop.

5. In extreme bithorax phenotypes, in which the metathoracic bud has formed a structure externally resembling a mesothorax, this region does not contain a

second set of flight-muscles, although there are sometimes small badly differentiated representations of them. The secondary scutellum is not provided with a post-notum.

6. If the normal mesothoracic bud of one side is extirpated from a larva which is developing the bithorax phenotype, the transformed metathoracic bud may shift forward and fuse with the mesothoracic bud of the opposite side. In some such cases the metathoracic mesoderm, in association with cells from the second trochanteral depressor, has developed into flight-muscles.

7. It is concluded that the migrating cells of the second trochanteral depressor provide a stimulus which is essential for the differentiation of the flight-muscles.

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to thank Professor C. H. Waddington, F.R.S., for providing me with his 'assimilated bithorax' stock, and for his great help in the preparation of the manuscript. I also thank the Egyptian Government for a research grant.

REFERENCES

- DEMEREK, M. (1950). *Biology of Drosophila*. New York: John Wiley. London: Chapman & Hall.
 FERRIS, G. F. (1943). Some fundamental concepts in insect morphology. *Microentomology*, **8**, 2-7.
 PANTELOURIS, E. M., & WADDINGTON, C. H. (1955). Regulation capacities of the wing- and haltere discs of wild type and bithorax *Drosophila*. *Roux Arch. EntwMech. Organ.* **147**, 539-46.
 SHATOURY, H. H. EL. (1955). Lethal no-differentiation and the development of the imaginal discs during the larval stage in *Drosophila*. *Roux Arch. EntwMech. Organ.* **147**, 523-38.
 SNODGRASS, R. E. (1935). *The Principles of Insect Morphology*. New York: McGraw-Hill.
 WADDINGTON, C. H. (1942). Growth and determination in the development of *Drosophila*. *Nature, Lond.* **149**, 264.
 — (1947). Regulation in bithorax and hemithorax. *Drosophila Inform. Serv.* **21**, 89.
 — (1953). The interaction of some morphogenetic genes in *Drosophila melanogaster*. *J. Genet.* **51**, 243-58.

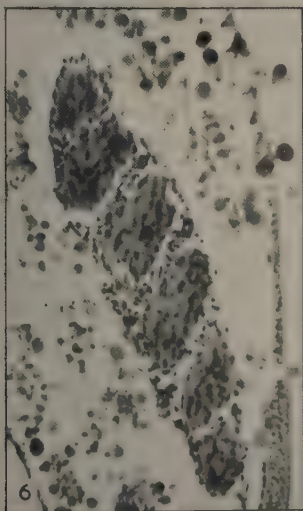
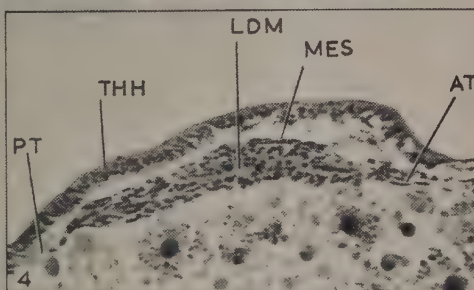
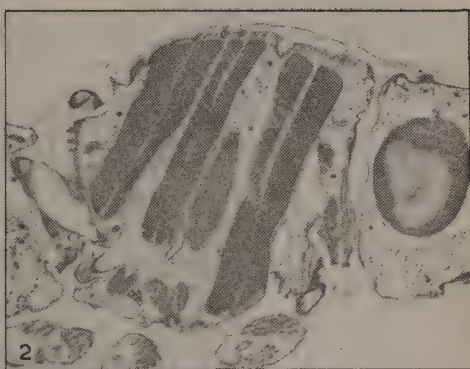
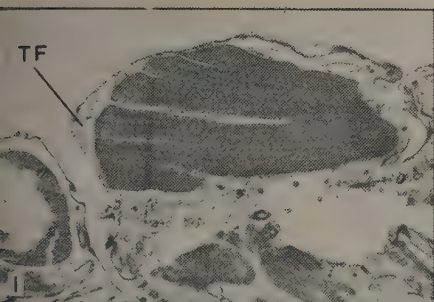
EXPLANATION OF PLATES

Abbreviations

AT, anterior tendons; CT, chitinous tendons; DM, dorsal muscles; HB, haltere bud; IDM, imaginal dorsal muscles; ITSM, imaginal tergo-sternal muscles; LDM, larval dorsal muscles; LM, lateral muscles; LTSM, larval tergo-sternal muscles; MC, migrating cells; MD, metathoracic depressor; MES, mesoderm; OS, outer sheath of muscle; PT, posterior tendon; SM, spiracular muscles; SPF, sub-coxa of the first leg; SPT, sub-coxa of the third leg; TEN, tendon; TF, tonofibrillae; THH, thoracic hypodermis; TRDP, mesothoracic depressor; TSM, tergo-sternal muscle; UM, undifferentiated myocytes; VG, ventral ganglia; WB, wing bud.

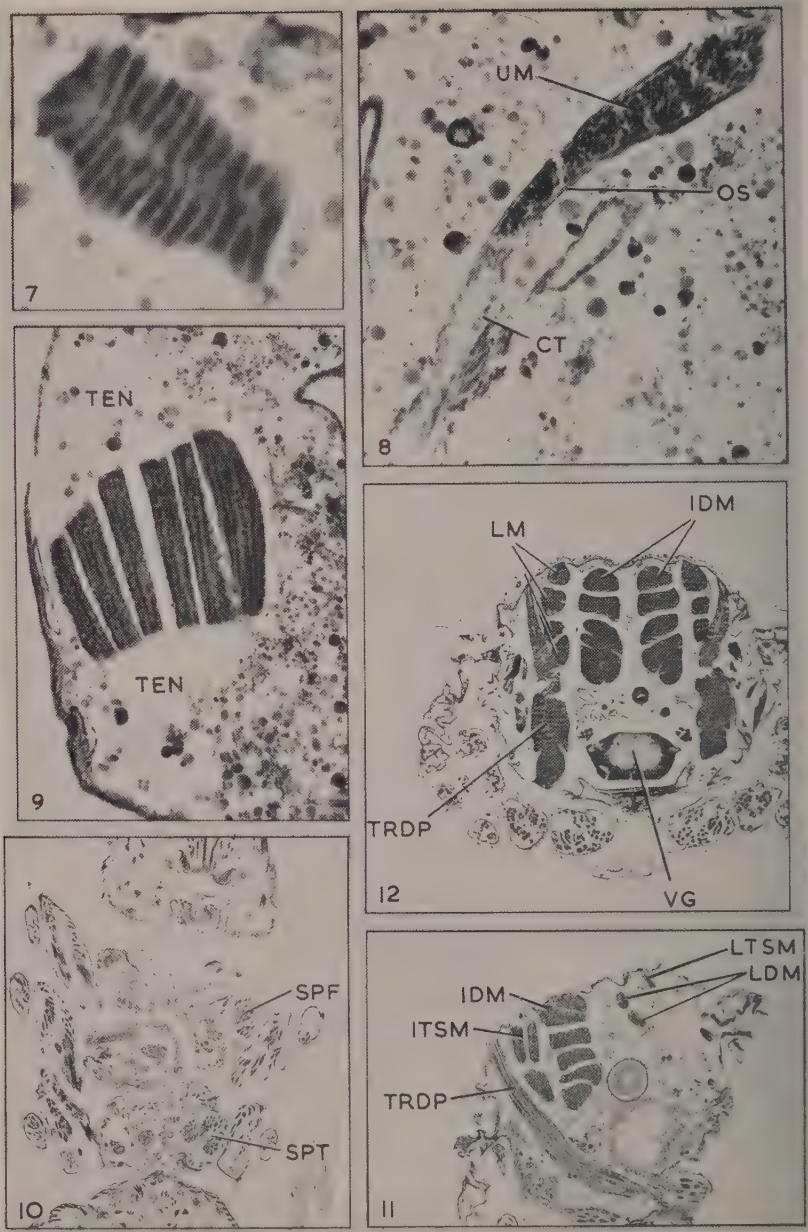
PLATE 1

- FIG. 1. Sagittal section of a late pupa showing a set of imaginal dorsal muscles.
 FIG. 2. Lateral section of a late pupa showing some muscles of the lateral set.
 FIG. 3. Accumulation of the wing bud myocytes around a dorsal larval muscle. $\times 150$.
 FIG. 4. Penetration of the myocytes into a larval dorsal muscle. $\times 150$.
 FIG. 5. Duplication of the dorsal larval muscles by cells from the mesothoracic depressor. $\times 70$.
 FIG. 6. Slightly older stage than the previous figure, after duplication and growth of the muscles has taken place. $\times 250$.



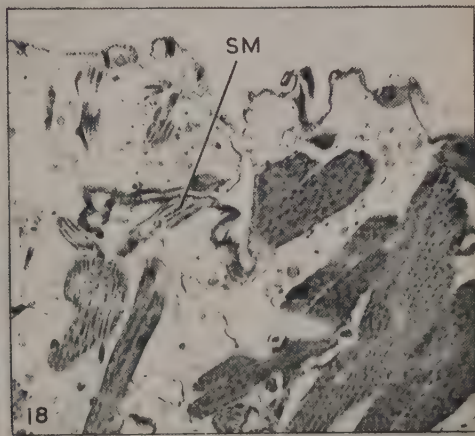
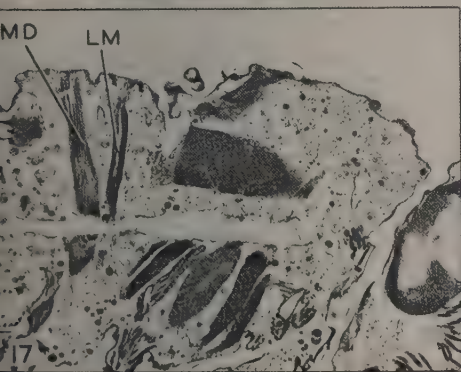
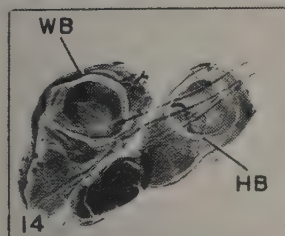
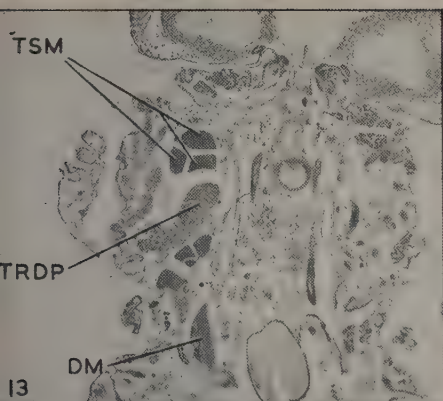
H. H. EL SHATOURY

Plate 1



H. H. EL SHATOURY

Plate 2



H. H. EL SHATOURY

Plate 3

PLATE 2

FIG. 7. Cross-section of an imaginal depressor. $\times 250$.

FIG. 8. Early stages in the differentiation of the mesothoracic depressor. $\times 150$.

FIG. 9. A lateral section of a 30-hour-old pupal thorax showing a set of six dorsal muscles with long tendons. $\times 110$.

FIG. 10. Ventro-frontal section of a pupa from which the second leg was removed. $\times 70$.

FIG. 11. Cross-section of a pupa similar to that in Fig. 10. $\times 110$.

FIG. 12. Cross-section of the thorax of a late wild type pupa. $\times 110$.

PLATE 3

FIG. 13. Medio-frontal section of a pupa similar to that in Fig. 10. $\times 110$.

FIG. 14. A whole mount of a set of dorso-lateral buds of a bithorax late third instar larva. $\times 55$.

FIG. 15. A sagittal section of a bithorax fly. $\times 55$.

FIG. 16. Sagittal section of a late bithorax pupa showing a dorsal muscle in the haltere-derived thorax. $\times 110$.

FIG. 17. A lateral section of a late bithorax pupa showing a lateral fibrillar muscle in the second thorax. $\times 110$.

FIG. 18. A section of a late bithorax pupa showing spiracular muscles. $\times 400$.

(Manuscript received 13:x:55)

Differentiation and Metamorphosis of the Imaginal Optic Glomeruli in *Drosophila*

by H. H. EL SHATOURY¹

From the Institute of Animal Genetics, Edinburgh

WITH TWO PLATES

INTRODUCTION

SHORT descriptions of certain parts of the brain of *Drosophila* have been given by a few workers. Richard & Furrow (1925) briefly considered the optic ganglia in their study of the eyeless mutant. Others have given a more generalized account of the different brain glomeruli (Hertweck, 1931; Strasburger, 1932; Power, 1943). However, no study has been made of the extent of differentiation of the imaginal brain in the larvae nor has there been any investigation of its development during metamorphosis.

MATERIAL AND METHOD

In the present work a description of the differentiation and metamorphosis of the optic glomeruli will be given. Material was collected at 5-hourly intervals, from hatching till 50 hours after the formation of the puparium. Hot Bouin was used as a fixative. Larvae were treated by Peterfi's celloidin method of double embedding. Puparia-free pupae were transferred to amyl acetate after being dehydrated in 90 per cent. alcohol. The application of silver impregnation techniques for staining was found unnecessary, since Delafield's haematoxylin was fairly satisfactory.

RESULTS

The structure of the imaginal optic glomeruli

The following brief description of the optic glomeruli of the adult has been mainly compiled from the work of Cajal & Sanchez (1915) and Power (1943).

The brain of *Drosophila* is composed of a cellular cortex and a fibrous core which is organized into aggregates of fibres called ganglia or glomeruli (Plate 1, fig. A). The optic lobes which make up the lateral portions of the brain hemispheres contain, in addition to the cellular cortex, three optic glomeruli: (1) The

¹ *Author's address:* Department of Zoology, Faculty of Science, Alexandria University, Egypt.
[J. Embryol. exp. Morph. Vol. 4, Part 3, pp. 240-247, September 1956]

external glomerulus and its auxiliary layers; these are the 'intermediate retina' of Cajal & Sanchez, since they designated the layer of ommatidia as the 'peripheral layer'. In frontal sections the structure is arc-shaped, with the convex surface more or less parallel to the faceted area. It is connected to the middle glomerulus by a true chiasma, whose two arms can only be seen in frontal sections. (2) The middle glomerulus appears as an oblong saucer whose thickness is about one-third its smaller diameter; it has several diagnostic features based on the arrangement of its component fibres (Power, 1943). (3) The internal glomerulus is a compound structure, made up of two unequal glomerular masses which are separated by the internal chiasma. The larger component is oval and lies anteriorly and is called the anterior inner glomerulus. The smaller is called the posterior inner glomerulus. The internal chiasma is not a true crossing, and originates from the fibres of the external chiasma after penetrating the whole width of the middle glomerulus.

The brain of the early larva

The brain of the newly hatched larva is composed of two cerebral hemispheres which are supra-oesophageal and are connected ventrally to the ventral ganglion. In sections, the brain cortex is largely composed of larval ganglion cells, with a lesser number of much smaller cells which have an intense affinity for basic dyes; a study of their development shows that they represent the primordia of some of the imaginal neurons. A third type of cell, which is distinguished by its much larger size occurs in very small numbers at the periphery of the cortex; these cells are called giant ganglion cells. Their number increases considerably in later stages. They have frequently been used for cytological studies on mitosis. Their function, however, is unknown.

In addition to these three types of cellular components of the brain hemispheres, there are imaginal nerve-cells which are arranged in two regular epithelia and lie in the caudal part of each hemisphere just next to the point of fusion with the ventral ganglion.

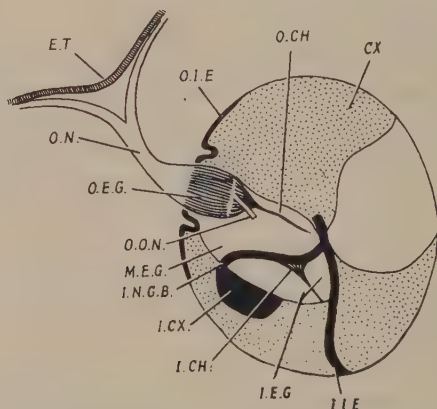
The detailed structure of these imaginal epithelia was easiest to study in late second or early third instar larvae where the nerve-supply to the cephalic complex makes its first appearance. Investigations of material of this age (Plate 1, fig. B) have shown that the two imaginal epithelia are parallel to each other and that they extend from the posterior margin of the fibrous brain mass to the extreme posterior end of the cerebral cortex. In transverse sections (Plate 1, fig. C) the ventral or outer epithelium appears saucer-shaped with inwardly bent lateral ends. It is interrupted in its middle part and it is through this interruption that the optic nerve leaves the brain (Plate 1, fig. C). The dorsal or inner epithelium is straight and is again discontinuous, but in this case in its anterior part next to the fibrous core. The nervous tissue included between these two imaginal epithelia appears to consist mainly, as shown in Plate 1, fig. C, of imaginal nerve-cells which, as will be shown later, represent the future outer glomerulus of the adult.

The origin of the optic nerve

The origin of the optic nerve was easiest to study in early stages of the third instar (Plate 1, fig. D). It was found that the fibrous mass of each brain hemisphere extends through the pore of the inner imaginal epithelium and extends as the optic nerve through the aperture of the outer epithelium. Later in the third instar, the proximal part of this extension differentiates into the outer fibrous mass while the distal part, which forms the optic nerve, sub-differentiates into structures which will be dealt with later.

The brain of mid-third instar larvae

While the brain hemispheres of early larval stages were more or less oval, as shown in Plate 1, fig. C, they become more rounded in mid-third instar larvae (Plate 1, figs. D and E). The change from oval to rounded is accompanied by a change in the position of the imaginal epithelia relative to the rest of the brain;



TEXT-FIG. 1. Diagrammatic representation of a transverse section of late third instar brain. For abbreviations see 'Explanation of Plates'.

the ventral epithelium has become ventro-lateral and the dorsal epithelium lies inside it. We may therefore refer to these two layers as outer and inner imaginal epithelia respectively.

The primordium of the outer glomerulus (ganglion) has increased considerably in size and shows a tendency to protrude through the aperture of the outer imaginal epithelium, which has somewhat increased in diameter (Plate 1, fig. D). In slightly older stages the former undergoes more protrusion as indicated in Plate 1, fig. E, and finally lies outside the rest of the brain. This process of protrusion has gradually brought about the extravasation of the lip of the pore of the outer imaginal epithelium.

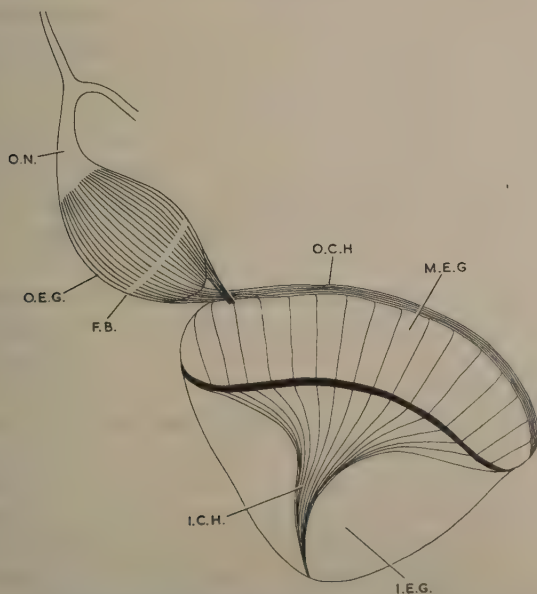
In 75-hour-old larvae (Plate 1, fig. E) the future outer ganglion has become differentiated into two distinguishable regions. There is a large outer segment

of condensed cells, which is separated by a fibrous layer from a much thinner inner region which is made up of the same type of cells. Investigations of earlier stages showed that this sub-differentiation of the outer ganglion occurred in the late second instar larvae soon after the appearance of the optic nerve. The latter originates from the distal portion of the protrusion of the fibrous core (Plate 1, fig. F); the bundle of fibres, after extending for a short distance through the outer ganglion, forms a longitudinal fibrous band from which side branches extend through the whole length of the remaining major part of the outer ganglion and unite outside the brain to form the optic nerve proper.

In 85-hour-old larvae the lip of the pore of the inner imaginal epithelium proliferates, its cells being pushed across the middle of the enlarged outer fibrous core and coming finally to rest on the ventral cortical cells just caudal to the future outer ganglion (Text-fig. 1). Subsequently, the outer fibrous core becomes divided into two equal portions which are separated by an interglomerular bridge. These two divisions represent the fibrous cores of the middle and inner glomeruli.

Formation of the optic chiasma

While fibrous extensions from the inner fibrous core of the brain hemispheres penetrate the future outer ganglion to form the optic nerve, the nerve-cells of the outer eye ganglion give rise to fibres which extend in the opposite direction and form the external and later the internal chiasma (Text-fig. 2).



TEXT-FIG. 2. Diagrammatic representation of the formation of the outer chiasma. For abbreviations see 'Explanation of Plates'.

Fibres of the outer ganglion leave its inner end in two separate collections (Text-fig. 2). One of these collections develops extensively so as to cover a large part of the border of the middle eye glomerulus. The other collection crosses the first one and runs along the non-innervated small part of the middle glomerulus. A chiasma composed of two unequal arms is thus formed. This external chiasma gives rise to fibres which penetrate the whole width of the middle glomerulus and further penetrate the inter-glomerular bridge and form a nerve-bundle which separates the inner glomerulus into two unequal glomeruli.

It will be obvious from the previous description that the three optic glomeruli and their important nerve-bundles become fully differentiated in late third instar larvae. A very significant phenomenon which was observed to occur simultaneously with the completion of differentiation was that the giant ganglion cells exhibit symptoms of degeneration so that late third instar brains do not contain them.

Metamorphosis of the brain

In 3-hour-old prepupa the brain hemispheres have become pear-shaped (Plate 2, fig. G). This may be attributed to the contraction of the cephalic complex during the formation of the puparium; this pulls the optic nerve which, in turn, stretches the lateral part of the brain in the region of the future eye ganglia. It is known that the optic bud metamorphoses to the ommatidial layer and to a part of the imaginal head hypodermis. It may be of interest that, as shown in Plate 2, fig. G, the optic nerve is biramous and that the segment of the optic bud located between the two arms represents the future eye tissue, and that the rest of the optic bud epithelium will become head hypodermis.

Cross sections of early pupal stages (Plate 2, fig. H) reveal that the cerebral hemispheres have become rounded again. The middle and inner optic glomeruli have become more defined and differentiated. Proliferations of the inner imaginal epithelium have largely replaced the ventral larval nerve-cells and formed the imaginal cortex of the inner imaginal glomerulus (Plate 2, fig. I). On the other hand, proliferations of the outer imaginal epithelium have developed into the cortex which surrounds the outer eye ganglion. The imaginal nerve-cells which were scattered between the larval nerve-cells have metamorphosed to the rest of the imaginal cortex.

Fig. J of Plate 2 is a fronto-dorsal section of the same stage as fig. I, and shows that the optic nerve has developed a network of nerve-fibres underneath the eye tissue, which appears contracted.

By 8 hours after pupation the eye tissue has stretched over a large area of the lateral sides of the head, and the optic nerve has expanded equally. The network of fibres of the optic nerve has become connected to the ommatidial layer. It is also at this stage that some of the histolytic products of the larval tissues in the head tend to be enclosed within the fibre network thus giving rise to a false

tissue which has been described by several authors as a component layer of the outer eye glomerulus and was given the name fenestrated zone.

In 30-hour-old pupae the inner and outer imaginal epithelia have become exhausted. The optic nerve has contracted sufficiently to bring about protrusion of the outer eye glomerulus which becomes separated from the rest of the brain by the outer chiasma which connects it with the middle glomerulus. It may be interesting to know that the inner and middle glomeruli, which only appeared in cross sections of earlier stages, would only appear in horizontal sections of this stage. This must be the result of the rotation of the brain hemisphere through an angle of 90° .

DISCUSSION

Kopec (1922) removed the brain of larval *Lymantria* without injuring the eye rudiment and found that there was neural tissue beneath the ommatidia of the imago. Bodenstein (1939) obtained similar results from transplanted eye-buds of *Drosophila*. Pilkington (1942) claimed that in his six successful transplants of wild type eye-buds, the external glomeruli developed from the eye-buds and not from the brain. This was indirectly supported by Power (1943), who found that (1) eyeless individuals with a complete absence of one or both eyes have no external glomerulus on the side which is eyeless, and (2) ten eyeless individuals were found with eyes that were not connected to the brain and these showed eyes with external glomeruli. However, as reported by Power, their structure was not normal, since the 'fenestrated zone' was hypertrophied and the external glomerulus proper did not show the normal diagnostic histological traits.

The previous description of the differentiation and development of the outer eye glomerulus has shown that it develops, like the other glomeruli, from the brain hemisphere and not from the optic bud. This histological evidence has been supplemented by transplantation experiments carried out along the same line as those of Bodenstein and Pilkington. Results of experiments of this kind should be carefully examined because, just as morphological artefacts exist, experimental ones may possibly occur.

Late third instar optic buds were transplanted into wild-type hosts of the same age, and shortly before the imagos hatched the transplanted eyes were dissected out and sectioned. Microscopic examinations of these buds agreed with the previous workers in that a layer of nondescript tissue with pycnotic nuclei was found beneath the layer of ommatidia. However, the study of hosts with transplants which were fixed at short successive intervals from the late third instar has shown that this tissue, which other authors have believed to be the outer eye glomerulus, is formed from the disintegration products of the larval tissues, which tend to accumulate around developing transplants.

These results suggest that the absence of the outer glomerulus in eyeless flies is not due to the absence of the optic bud which, according to Chen (1929), disintegrates at the end of the second instar. It may be that the eyeless mutation

prevents the differentiation of the outer glomerulus as well as causing the disintegration of the optic bud; or it may primarily affect the differentiation of the former which secondarily influences the latter. However, the structure of the brain of third instar eyeless larvae was reported by Chen to be normal, and it seems therefore necessary to check Chen's results before any conclusion about the action of the eyeless mutation can be made.

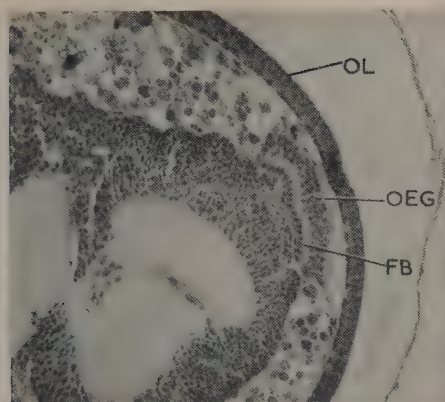
We have seen that the size of the giant ganglion-cell tissue increases in step with the pre-imaginal differentiation of the optic glomeruli. At the end of the third instar, when differentiation is completed, the giant ganglion cells exhibit symptoms of degeneration and later disappear. Similar phenomena occur in several other developing tissues of *Drosophila*. For instance, the lymph glands of the late third instar wild-type larvae degenerate after the imaginal buds have become differentiated. Another example is the degeneration of 'activating cells' derived from the lymph glands after the larval primordia have been brought to the state when they can begin imaginal differentiation (Shatoury, 1956 and in preparation). In these cases the degenerative changes were envisaged in terms of immunological phenomena, that is to say, the tissues become antigenic to the individual of which they form part and stimulate the production of immune bodies whose effect was shown in all cases by complement-reactions. The behaviour of the giant ganglion cells after the optic ganglia have differentiated is easy to explain in similar terms. We may assume that the former induces the differentiation of the latter and that at the end of the third instar they become involved in an immune reaction. This hypothesis is now being tested in mutants where the giant cells are antagonized in early larval stages.

SUMMARY

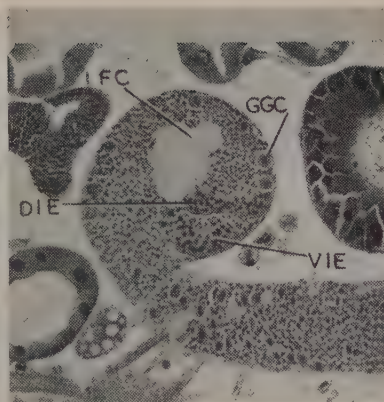
1. A description has been given of the differentiation and metamorphosis of the optic glomeruli.
2. The giant ganglion cells of the larval brain degenerate at the end of the third instar after differentiation to the imaginal brain primordia is completed.
3. The outer eye glomerulus was found to differentiate from the brain and not from the optic bud.
4. The 'fenestrated zone' of the outer eye ganglion is an artefact, and develops from the histolytic products of the larval tissues in the head.
5. The condition in the mutant eyeless is discussed.

ACKNOWLEDGEMENT

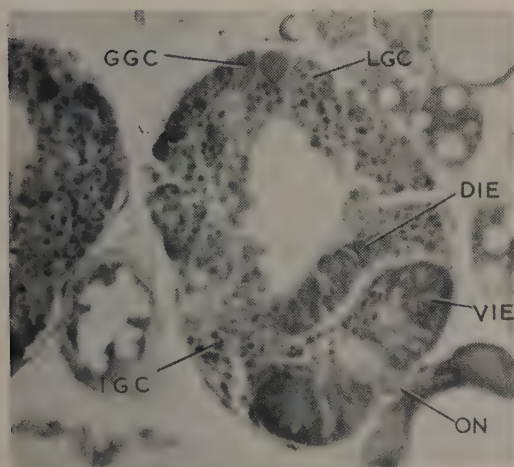
I am very grateful to Professor C. H. Waddington, F.R.S., for reading and correcting the manuscript.



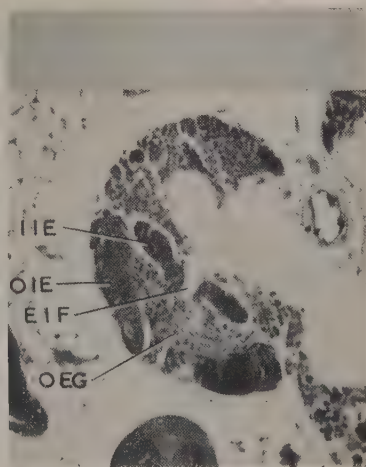
A



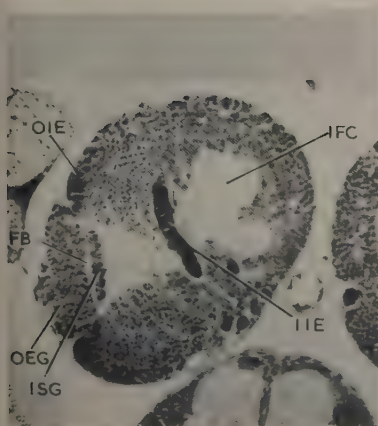
B



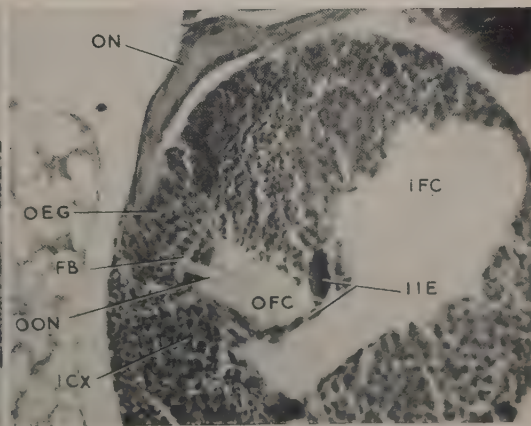
C



D



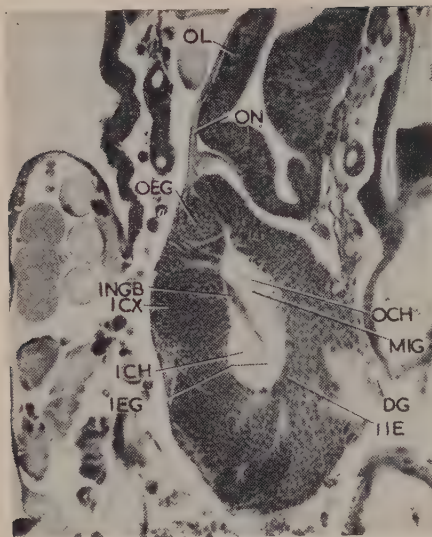
E



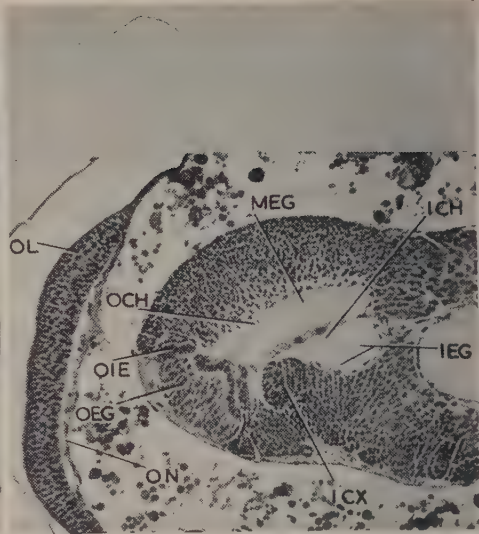
F

H. H. EL SHATOURY

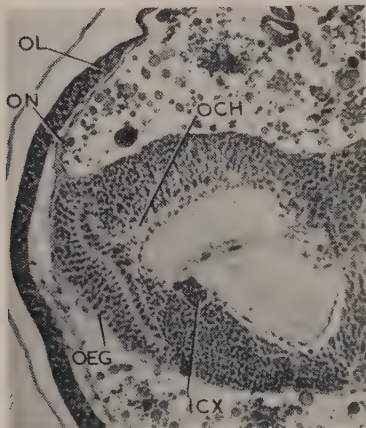
Plate 1



G



H



I



J

H. H. EL SHATOURY

Plate 2

REFERENCES

- BODENSTEIN, D. (1939). Investigations on the problem of metamorphosis. VI. Further studies on the pupal differentiation centre. *J. exp. Zool.* **83**, 329-56.
- CAJAL, S. R., & SANCHEZ, D. (1915). Contribución al conocimiento de los centros nerviosos de los insectos. *Trab. Lab. Invest. biol. Univ. Madr.* **16**, 109-39.
- CHEN, T-Y. (1929). On the development of imaginal buds in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *J. Morph.* **47**, 135-99.
- HERTWECK, H. (1931). Anatomie und Variabilität des Nervensystems und der Sinnesorgane von *Drosophila melanogaster* (Meigen). *Z. wiss. Zool.* **139**, 559-663.
- KOPEC, S. (1922). Mutual relationship in the development of the brain and eyes of Lepidoptera. *J. exp. Zool.* **36**, 459-67.
- PILKINGTON, R. W. (1942). Facet mutants of *Drosophila*. *Proc. zool. Soc. Lond. A*, **111**, 199-222.
- POWER, M. E. (1943). The effect of reduction in numbers of ommatidia upon the brain of *Drosophila melanogaster*. *J. exp. Zool.* **94**, 33-71.
- RICHARDS, M. H., & FURROW, E. Y. (1925). The eye and optic tract in normal and eyeless *Drosophila*. *Biol. Bull. Wood's Hole*, **48**, 243-58.
- SHATOURY, H. H. EL (1956). An immunological hypothesis on the development of tumours in *Drosophila*. *Roux Arch. EntwMech. Organ.* **148**, 391-401.
- STRASBURGER, M. (1932). Bau, Funktion, und Variabilität des Darmtrakts von *Drosophila melanogaster* (Meigen). *Z. wiss. Zool.* **140**, 539-649.

EXPLANATION OF PLATES

ABBREVIATIONS

DIE, upper imaginal epithelium; EIF, extension of the inner fibrous core; ET, eye tissue; FB, fibrous band of the optic nerve; GGC, giant ganglion cells; ICH, inner chiasma; ICX, imaginal cortex of the inner glomerulus; IEG, inner eye glomerulus; IFC, inner fibrous core; IGC, imaginal ganglion cells; IE, inner imaginal epithelium; INGB, inter-glomerular bridge; ISG, inner segment of the outer glomerulus; MEG, middle glomerulus; OCH, outer chiasma; OEG, outer glomerulus; OFC, outer fibrous core; OIE, outer imaginal epithelium; OL, ommatidia layer; ON, optic nerve; OON, origin of optic nerve; LGC, larval ganglion cells; VIE, ventral imaginal epithelium.

PLATE 1

FIG. A. Frontal section in the head of a late pupa. $\times 210$.

FIG. B. Medio-sagittal section in the brain and ventral ganglion of an early third instar larva. $\times 210$.

FIG. C. Transverse section in the brain of same stage as fig. B. $\times 500$.

FIG. D. Transverse section in the brain of 10-hour-old third instar larva. $\times 210$.

FIG. E. Transverse section in the brain of mid-third instar larva. $\times 225$.

FIG. F. Section in the brain of late third instar larva showing the origin of the optic nerve. $\times 500$.

PLATE 2

FIG. G. Horizontal section in a 3-hour-old prepupa. $\times 210$.

FIG. H. Transverse section in early pupa. $\times 210$.

FIG. I. Transverse section of a pupa slightly older than that in fig. H. $\times 210$.

FIG. J. Front-dorsal section of same stage as fig. I. $\times 210$.

(Manuscript received 25:xi:55)

Studies on Embryonic Induction using Radioactive Tracers

by J. L. SIRLIN, S. K. BRAHMA, and C. H. WADDINGTON¹

From the Institute of Animal Genetics, Edinburgh

WITH ONE PLATE

INTRODUCTION

THE nature of the agent which brings about induction during the early development of vertebrates has been extraordinarily difficult to determine. As yet we are not even certain whether there is a passage of a comparatively massive quantity of material from the organizer into the reacting competent tissue, as is probably most usually assumed, or whether the action is primarily located at the surface of intercellular contact, as suggested by Weiss (cf. 1947, 1950). Waddington & Goodhart (1949) showed that certain unnatural evocators (steroids) certainly penetrate the competent tissues, and can be recognized inside the reacting cells by their ultraviolet fluorescence. This finding does not by any means solve the problem as far as concerns the substances involved in natural induction. A possible method of attack here would seem to be the use of radioactive tracers. Abercrombie & Causey (1950) used P_{32} to label chick grafts and showed that the diffusion of the tracer into the reacting tissues was sufficiently restrained for the graft to remain easily distinguishable from the host, but they did not attempt to ascertain whether any minor passage of tracer occurs. Waddington (1950) attempted to use P_{32} to follow the transfer of substances in induction, the inducing agent employed being dried yeast which had been labelled. It was found that the tracer passed into the induced tissues in easily recognizable quantities; but it was pointed out that although a negative result would have been strong support for the hypothesis of surface action, the fact that tracer is transferred does not justify any far-reaching conclusions of a positive kind, since it remains unknown whether the P_{32} moves in the form of simple radicals such as the phosphate ion or of large macromolecules such as nucleic acids.

The availability of amino-acids and purines labelled with C_{14} or S_{35} has made possible further work along similar lines. It is particularly desirable to discover whether such tracers can give any useful information about the transfer of proteins and/or nucleic acids, since Brachet (1945, 1955) has argued that induction probably involves a rather massive passage of nucleoprotein microsomes from

¹ *Authors' address:* Institute of Animal Genetics, West Mains Road, Edinburgh 9, U.K.

the inductor into the reacting tissue. Ficq (1954), from Brachet's laboratory, has described experiments of this kind in which the location of the tracer was recognized by β -track autoradiography. She interpreted her results on whole embryos as affording some support to Brachet's hypothesis, but she laid little stress on results with ectodermal sandwiches which seem to indicate that diffusion of free tracer played a considerable part. In our work, which was carried out simultaneously with that of Ficq, stripping film autoradiography was used; a short preliminary report of some of the results has already been made (Waddington & Sirlin, 1955).

MATERIAL AND METHODS

Two series of experiments have been made, the first consisting of grafts into whole young gastrulae, while in the second the labelled organizers were enclosed in 'sandwiches' of gastrula ectoderm, either with or without the interposition of a porous membrane between the organizer and the ectoderm.

In the first series of experiments, a number of different species of urodeles were used for grafts and hosts. The donors were labelled by cultivation for some hours in Holtfreter solution containing methionine- S_{35} or glycine- $1-C_{14}$ or glycine- $2-C_{14}$, embryos younger than the gastrula stage being opened in the animal field to facilitate the penetration of the radioactive compound. Grafts from the organizer or animal pole regions of early gastrulae, and from the posterior axis, brain, and eye regions of tail-bud stages, were inserted into the blastocoels of unlabelled young gastrulae. The operated embryos were fixed, usually 2 days later, the fixative employed being Carnoy. After sectioning in the usual way, the slides were covered with Kodak stripping film, and autoradiographs prepared, the exposure being long enough to give grain densities over the transferred tracer easily appreciable by normal microscopical examination.

In these experiments the autoradiographs of the grafts were so blackened that details of their structure could not be made out with certainty. Tracer has passed from them into the neighbouring tissues. This was so with all three tracers and for all types of graft. The tracer spread around the graft in all directions, but its distribution is not uniform, either as between tissues or as between nucleus and cytoplasm. It is incorporated in neural tissue, if any has been induced, and also tends to pass to the superficial layer of the epidermis even where this has not been induced to form neural plate. It is markedly less concentrated in endoderm, even when this lies in immediate contact with the graft. In the tissues into which it passes, the tracer is particularly noticeable in the nuclei, which can be recognized as clearly as if they had been deeply stained (Plate, fig. A). The activity is the greater the nearer the nucleus is to the graft. There are, however, some grains over the cytoplasm of these cells, and these can scarcely be attributed solely to cross-radiation from the nuclei; one can conclude that some tracer has also been incorporated into cytoplasmic substances.

In the second series of experiments, organizers from very early gastrulae of

Triturus alpestris were incubated with continuous agitation for 3 hours in Holtfreter solution containing 5 μ c./c.c. of either glycine-2-C₁₄ (specific activity: 8.33 mc./mM.) or adenine-8-C₁₄ (specific activity: 4.76 mc./mM.) together with 0.1 per cent. sodium sulphadiazine (May & Baker). They were then carefully rinsed three times in solutions of similar concentration prepared with non-radioactive substances, and finally given two rinses of normal Holtfreter. They were then implanted between two flaps of presumptive ectoderm from early gastrulae of the same species. These sandwiches were cultured for 3 days at room temperature, the medium being changed at least once during this time. They were fixed in aqueous Bouin, embedded in the usual way and sectioned at 5 μ , the picric acid deposited in the sections being bleached with lithium carbonate. The sections were coated with Kodak autoradiographic film and exposed for 35 days. After processing, the autoradiographs were stained with carmalum (as suggested by A. Glucksmann). The distribution of the tracer was determined by subjective appreciation of the density of the autoradiographs; with experience this is within the accuracy set by the experimental conditions.

Nine sandwiches were prepared with glycine-labelled organizers, and these gave five neural inductions ranging from palisades to well-developed closed neural tubes. They all gave extremely similar pictures. The grafts showed a high concentration of tracer in the nuclei, with some also present in the cytoplasm. Each individual cell of the graft can be distinguished with certainty from host cells. The passage of tracer into the ectoderm which has been induced to form neural tissue is greater than into that which is developing into epidermis (Plate, fig. B). In both types of ectoderm, the concentration of tracer falls off in a gradual gradient from the graft, but there is also, in the non-neural ectoderm, a tendency for tracer to become more concentrated in the most superficial layer than the distance from the graft would suggest. In the thicker parts of the sandwich, no tracer could be detected in the regions of ectoderm farthest removed from the graft.

In all tissues, the transferred tracer is considerably more concentrated in the nuclei than in the cytoplasm. This is very obvious in areas with high levels of transferred activity, such as the induced neural tissue and the outermost layer of ectoderm. The quantity of tracer which has migrated is only a rather moderate fraction of that remaining in the graft.

Of nine sandwiches grafted with adenine-labelled organizers seven showed induced neural tissues. These were also very similar to each other. The grafts showed a somewhat higher density of tracer in the nuclei than in the cytoplasm, but often the difference was not so marked as with the glycine. The total uptake of tracer was also less than in the previous series.

The pattern of migration of the tracer is very similar to that found with glycine. There is preferential migration into the induced neural tissue and the concentration of migrated tracer falls off gradually from the graft, some of the farthest ectoderm having received no appreciable quantity. The transferred tracer is

again mainly concentrated in the nuclei, although some is present in the cytoplasm. The amount of activity transferred, relative to that remaining in the graft, is greater than with glycine. For this reason, and because adenine passes into the graft less readily than glycine, it was sometimes difficult to decide with certainty whether certain cells near the border of the graft belonged to it or to the host.

In some cases the tracer has been found to be incorporated into chromosomes, which probably belong to host tissues.

Some sandwiches were prepared, both with glycine- and with adenine-labelled organizers, in which a porous membrane was interposed between the organizer and one of the two flaps of ectoderm. The membranes used were Gradocol (average pore diameter: 1.45μ) and cellophane. In all such cases, the only inductions obtained were on the side of the organizer opposite to the membrane, no case of induction through the membrane being encountered. In the small series available, it proved impossible to determine with certainty whether any tracer had migrated through the membrane into tissue on the other side, since the uncertainties due to possible shifting of the relative positions of membrane and organizer, and to the passage of tracer through tissues around the edges of the membrane, were considered too great to allow any definite conclusions to be drawn. However, in several cases involving glycine-labelled organizers and Gradocol membranes, it was observed that, although the membrane had been dissolved during the histological preparation of the specimen, an appreciable quantity of tracer remained on the site which had been occupied by it. Thus tracer, in a form resistant to the solvents used in the treatment of the sections, must have been diffusing through the membrane.

DISCUSSION

The experiments which have been described above do not provide any considerable positive support for the suggestion that induction involves a transfer of cytoplasmic granules from the organizer into the competent tissue. In fact, they militate rather strongly against the possibility of any *massive* transfer of this kind. The tracer which moves into the reacting tissue becomes concentrated mainly in the nuclei, and only considerably less can be detected in the cytoplasm. The fact that there is some in the latter location makes it impossible to rule out the possibility that some movement of microsome-like particles occurs, but if it does so it must be on a rather small scale.

It is noteworthy that the tracer is transferred more actively into cells which have been induced to develop into neural tissue than into the other host tissues which have failed to respond to the graft. This was particularly clear in the second series of experiments in which sandwiches were used. It is not obvious what significance should be attached to this. There seem to be two types of explanation which require consideration. One may suppose that the transfer of tracer is, as was hoped when the experiment was undertaken, closely connected

with the process of induction; alternatively it might be that during its movement from graft to host the tracer is in the form of small molecules (amino-acids, polypeptides, &c.) which act merely as raw materials for general metabolism and have little direct connexion with the inducing agent. The latter suggestion is supported by Ficq's observation of similar concentrations of tracer in the host and induced neural systems of whole embryos. The preferential accumulation of the tracer in the induced neural tissue and the outer layers of the epidermis in our experiments could be accounted for on the latter hypothesis by the fact that the nuclei of these tissues are known to take up the greatest quantities of free amino-acids from solution (Sirlin & Waddington, 1954; Waddington & Sirlin, 1955; Sirlin, 1955). Indeed, the high concentration of tracer in the outer epidermal layer in these experiments would not be expected if the tracer were intimately connected with evocation. On the other hand, there are some reasons which make it doubtful whether the tracer moves in the form of free amino-acids or purines. For instance, the fact that it does not become distributed evenly throughout the whole of the ectodermal sandwiches, but appears in the form of a gradient, suggests a slow rate of diffusion. Again, the presence of glycine-tracer in the position from which a porous filter has been dissolved away shows that it was in a form which is precipitable by protein fixatives and not soluble in the usual histological reagents. It seems likely, therefore, that at least some of the tracer moves in the form of large molecular compounds, though it may be that another part of it is broken down to free amino-acids. It remains uncertain whether the large-molecular fraction has any tissue specificity or close connexion with the evocator, but the higher concentration of tracer in the induced tissues perhaps suggests that there is some selective migration into them, accompanying the general diffusion of non-specific molecules. Attempts are being made to reduce the uptake of diffused free tracer by isotope dilution methods.

SUMMARY

1. Organizer and other tissues of urodele gastrulae were labelled by cultivation in glycine- C_{14} , methionine- S_{35} , or adenine-8- C_{14} . They were then either inserted into the blastocoel of unlabelled hosts or made into 'sandwiches' between two flaps of gastrula presumptive ectoderm. Two or three days later the location of the tracer was investigated by stripping film autoradiography. The sandwich experiments gave the clearer results.

2. The tracer passed into the tissues surrounding the graft and was accumulated mainly in the nuclei, though some was also present in the cytoplasm. A higher concentration was reached in the induced neural tissue and outermost layer of the epidermis than in other tissues.

3. A greater fraction of adenine was mobile than of the amino-acids.

4. The evidence suggests that there is no massive transfer of cytoplasmic particles and that there is considerable diffusion of tracer in the form of small molecules. It does not rule out the possibility of a relatively slight transfer of

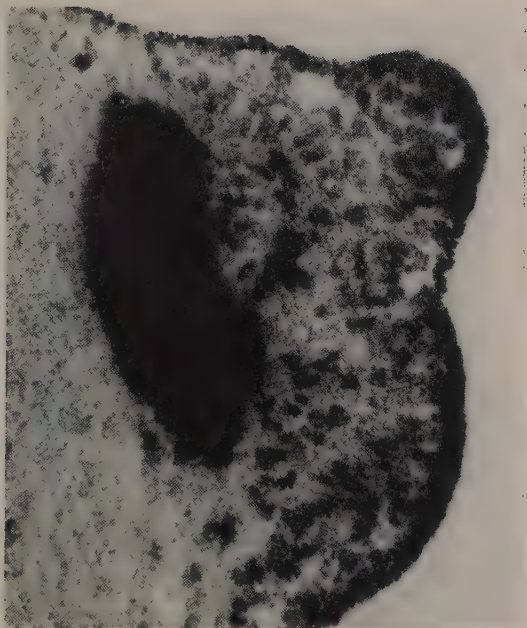


FIG. A

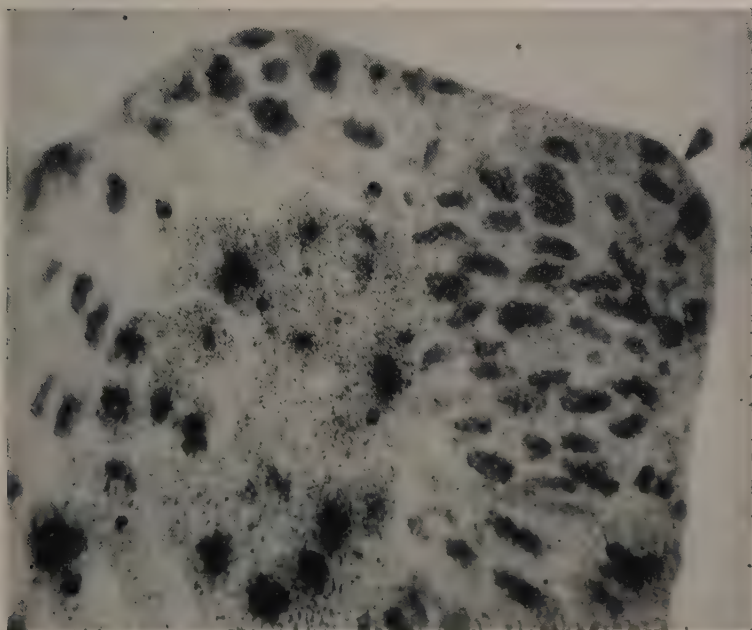


FIG. B

cytoplasmic particles, and, indeed, suggests that there is some specific migration of tracer into induced tissues, though it remains uncertain in what form this occurs.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was carried out under the tenure of grants from the British Council and the British Empire Cancer Campaign (J.L.S.) and of the T. N. Palit Fellowship, University of Calcutta (S.K.B.). Financial support was also received from the Agricultural Research Council.

REFERENCES

- ABERCROMBIE, M., & CAUSEY, G. (1950). Identification of transplanted tissues in chick embryos by marking with phosphorus-32. *Nature, Lond.* **166**, 229-30.
- BRACHET, J. (1945). *Chemical Embryology*. New York: Interscience.
- (1955). The biological role of the pentose nucleic acids, p. 475 in *Nucleic Acids*, vol. ii, ed. Chargaff & Davidson. New York: Academic Press.
- FICQ, A. (1954). Analyse de l'induction neurale chez les Amphibiens au moyen d'organismes marqués. *J. Embryol. exp. Morph.* **2**, 194-203.
- SIRLIN, J. L. (1955). Nuclear uptake of methionine-S₃₅ in the newt embryo. *Experientia*, **11**, 112.
- & WADDINGTON, C. H. (1954). Nuclear uptake of glycine-2-C₁₄ in the newt embryo. *Nature, Lond.* **174**, 309.
- WADDINGTON, C. H. (1950). The passage of P₃₂ from dried yeast into amphibian gastrula ectoderm. *Nature, Lond.* **166**, 566.
- & GOODHART, C. B. (1949). Location of absorbed carcinogens within the amphibian cell. *Quart. J. micro. Sci.* **90**, 209-19.
- & SIRLIN, J. L. (1954). The incorporation of labelled amino-acids into amphibian embryos. *J. Embryol. exp. Morph.* **2**, 340-7.
- (1955). Studies in amphibian embryogenesis using labelled grafts. *Proc. Roy. Phys. Soc. Edin.* **24**, 28-31.
- WEISS, P. (1947). The problem of specificity in growth and development. *Yale J. Biol. Med.* **19**, 235-88.
- (1950). Perspectives in the field of morphogenesis. *Quart. Rev. Biol.* **25**, 177-98.

EXPLANATION OF PLATE

FIG. A. An eye and brain graft labelled with glycine-2-C₁₄ (left) has induced an epidermal thickening (right). Note dense autoradiographs on graft and induction, and faint autoradiographs on the internal endoderm. The dark appearance of the outer epidermal layer is due to pigment and histological stain. Mayer's acid haemalum. ($\times 230$.)

FIG. B. Neural palisade (right) induced by an organizer graft labelled with glycine-2-C₁₄ (left). Note very dense autoradiographs on the graft, particularly on the nuclei. The autoradiographs on the palisade are much stronger than on the epidermis in the upper part of the figure. Carmalum. ($\times 410$.)

(Manuscript received 8: xi: 55)

The Ectodermal Thickening and Ridge in the Limbs of Staged Human Embryos¹

by RONAN O'RAHILLY, ERNEST GARDNER, and D. J. GRAY²

From the Departments of Anatomy, Wayne University College of Medicine, Detroit, Michigan, and Stanford University School of Medicine, Stanford, California

WITH TWO PLATES

INTRODUCTION

THE limbs of amniote embryos are characterized by a thickening of the epiblast at their tips (Balfour, 1885). Kölliker (1879) illustrated such a thickening in a section of a chick embryo and, according to Braus (1906), was responsible for the term 'ectodermal cap' (*Ektodermkappe*). Saunders (1948) showed in the chick by experimental means that 'the thickened ectoderm at the apex of the bud' is 'essential to the formation of the limb'.

A similar thickening has frequently been noted at the apex of developing mammalian limbs. It can be seen in figures 3, 4, and 5 of Lewis's (1902) paper on the development of the upper limb in man. Bardeen & Lewis (1901, fig. 19) called attention to the thickened epithelium at the free edge of the human lower limb bud. Steiner (1929, fig. 5), in a study of the development of human skin, illustrated the 'ectodermal cap' in the upper limb of a 9-mm. human embryo. He stated that it is several layers thick, that it is found mainly on the caudal and medial surfaces of the limb anlagen, and that it probably has a formative influence on mesoderm. The ectodermal ridge is present in a photomicrograph of a 10-mm. embryo published by Haines (1947, fig. 1). An 'epithelial plaque' at the apex of a 10-mm. human upper limb bud is figured by Hamilton, Boyd, & Mossman (1952, fig. 381).

Fischel (1929) referred to the higher epithelium located at the distal end of the limb bud in many types of animals and termed *Epithelfalte*, *Ektodermkappe*, or *Randfalte*. He considered the term *Epithelverdickung* more appropriate in the human embryo and he showed this thickening at 6 mm. and at 9 mm. in two of his illustrations. He regarded the thickening as a growth centre for increase in

¹ This investigation was supported by research grants A-550(C2) and A-532(C7) from the National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases, of the National Institutes of Health, Public Health Service, Bethesda, Maryland.

² Address: Department of Anatomy, Wayne University College of Medicine, 1401 Rivard, Detroit 7, Michigan, U.S.A.

size of the limb anlage and also as an organization centre which exerts a formative influence on embryonic connective tissue (p. 777). He considered that the thickening is responsible for the axial condensation of the blastema and that the high epithelium found on the 'inner' (presumably ventral) surface of the limb anlage plays a similar role.

Drawings and photomicrographs reproduced by Streeter (1949) show the ectodermal thickening and ectodermal ridge. Furthermore, Streeter (1948) called attention to the thicker skin ectoderm found over more condensed areas of head mesenchyme, particularly in the mandibular and hyoid regions. According to Streeter such thickenings suggest increased functional activity. He stated that 'thick skin ectoderm and marked proliferation of the mesenchyme with which it is in contact are likewise characteristic of the limb buds, and doubtless are an expression of some interaction between the two tissues' (horizon 16, p. 157). Blechschmidt (1948, 1951) believed that the band of thickened head ectoderm is continuous with those located on the upper limbs, and that these latter are in turn continuous with those found on the lower limbs. Thus he illustrated a ring of thickened ectoderm, *Ektodermring*, part of which is found on the ventral aspects of the limb buds. Blechschmidt reproduced photomicrographs of later stages which show the *Ektodermkappe* or *Randreifen*.

In Blechschmidt's laboratory Strube (1950) made a detailed study of the thickness of the surface epithelium of a 7.5-mm. human embryo. He found that the ectodermal ring ranged from 7 to 24 μ in thickness, and that the ectodermal ridges of the upper and lower limbs ranged from 13 to 24 μ . With the exception of the olfactory pit (25–54 μ), the epithelium of the ectodermal ring and ridges was the thickest on the surface of the body. The writers wish to thank Professor E. Blechschmidt, of Göttingen, for the loan of Dr. Strube's dissertation.

The work of Saunders clearly indicates the importance of this ectoderm in avian limb development. It may well be equally important in other amniote embryos, in which it seems to occur constantly. It is of interest, therefore, to have further information concerning this portion of the ectoderm in human embryos, particularly as regards precise location, microscopic structure, time of first appearance, and relationship in time to internal differentiation in the limbs. Precise information on these points can be obtained only from an examination of carefully staged embryos. Such a study was made of embryos in the collection of the Department of Embryology, Carnegie Institution of Washington. These embryos had been staged according to Streeter's developmental horizons (1942–51). The writers are indebted to Dr. George W. Corner, Director, for the opportunity to undertake this work.

MATERIAL AND METHODS

Serial sections of the limbs of seventy staged human embryos were studied. These embryos, belonging to horizons 11 to 19 inclusive, ranged from approximately 3 to 20 mm. in length. In addition, an accurate plaster reconstruction of

one embryo in each horizon from 12 to 17 inclusive was examined, and the shape, size, and orientation of the limbs were determined. From a study of the sections of the modelled embryo the location and shape of the ectodermal thickenings and ridges were mapped out on the model.

Throughout this paper, in the description of both upper and lower limbs, the term 'dorsal' refers to that aspect next to the directly adjacent somites or vertebrae.

OBSERVATIONS

Horizon 11 (2.0–5.0 mm.)

Only the oldest specimen in this age group (No. 2053) was examined. Neither limb buds nor ectodermal thickenings were found.

Horizon 12 (2.5–5.8 mm.)

Upper limb buds were present in all seven specimens examined in this age group. In specimen No. 5923, a plaster reconstruction of which was available, the upper limb was present as a diffuse swelling opposite the eighth to tenth somites inclusive. It possessed ventral and dorsal surfaces, separated by a rounded lateral margin. The ectoderm on the ventral surface and lateral margin was thickened (Text-fig. 1; Plate 1, fig. A). The basal layer (stratum germinativum) of this ectoderm showed two rows of nuclei.

The lower limb buds were present in only one of these seven specimens, No. 1062, which is listed by Streeter as a 'transition to age group 13'. They were present as slight swellings on which the overlying ectoderm was not thickened.

Numbers 1062, 5923, 6097, 6144, 8941, 8942 showed an ectodermal thickening in the upper limbs; it was doubtful in the limbs of No. 8943. Number 1062 showed no thickening in the lower limbs.

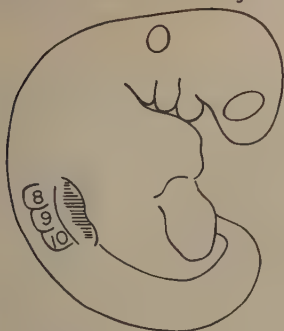
Horizon 13 (3.0–6.0 mm.)

Both upper and lower limb buds were present in five specimens examined in this age group. Only the lower limbs were available in a sixth specimen. A study of a plaster reconstruction of specimen No. 836 suggested that the upper limb, in growing ventrally, had acquired ventral and dorsolateral surfaces, separated by a ventrolateral border. The ectodermal thickening occupied the ventral surface and the ventrolateral margin (Text-fig. 1). Several layers of nuclei were apparent in the thickening, which shaded off gradually into the adjacent thinner ectoderm (Plate 1, fig. B).

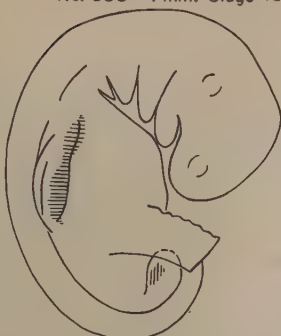
The slight swellings comprising the lower limbs had indistinctly separated ventral and dorsal surfaces. The ectodermal thickening was limited to the ventral surface and was very indistinctly separated from the adjacent ectoderm.

Numbers 836, 7889, 8066, 8119, 8581 showed ectodermal thickenings in both upper and lower limbs. Number 8967 showed a thickening in the lower limbs (the upper limbs were not available).

No. 5923 28 s. 4 mm. Stage 12



No. 836 4 mm. Stage 13



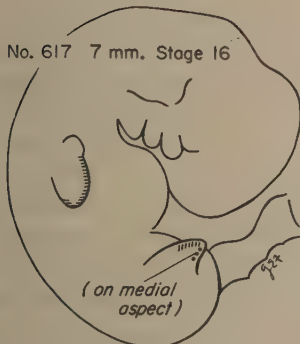
No. 4245-6 7 mm. Stage 14



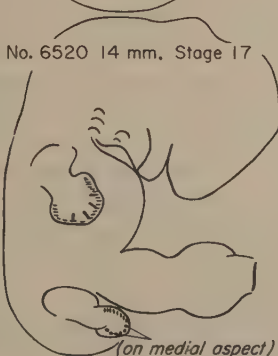
No. 3952 6.7 mm. Stage 15



No. 617 7 mm. Stage 16



No. 6520 14 mm. Stage 17



TEXT-FIG. 1. Illustration to show the location of the ectodermal thickening (upper limbs, horizons 12-13; lower limbs, horizons 13-14) and ectodermal ridge (upper limbs, horizons 14-17; lower limbs, horizons 15-17) in the limbs of staged human embryos. The embryo outlines, which are not drawn to the same scale, are based on photographs of actual specimens. The ectodermal thickening and ridge, indicated by hatching, were transferred from accurate plaster reconstructions of the embryos, on which they had been plotted as a result of an examination of the appropriate serial sections. For ease in comparison the outlines and hatchings are oriented as if they had all been taken from the same (right) side of the body. The number of the embryo, together with its length and horizon, is indicated in each instance.

Horizon 14 (4.9–8.2 mm.)

Eight specimens were examined. The upper limb buds were more elongated in this stage and their distal ends projected free of the body wall. Thus, at this horizon, the upper limb could be described for the first time as having a proximo-distal axis. Reference to a plaster reconstruction of specimen No. 4245–6 showed that each upper limb possessed a larger, convex, dorsolateral surface, a smaller, concave, ventromedial surface, a ventrolateral border, and a caudal tip. The lateral portion of the ectodermal thickening formed a prominent elevation, the ectodermal ridge, which occupied the ventrolateral or pre-axial border of the limb (Text-fig. 1). The ridge contained several layers of nuclei in the stratum germinativum (Plate 1, fig. C). Either a few vessels or a single marginal vessel (marginal vein) subjacent to the ectodermal ridge were present in the majority of specimens examined.

The lower limb showed a smaller, flat or concave, ventral surface, and a larger, convex, dorsal surface. The ectodermal thickening extended across the rounded ventrolateral border (Text-fig. 1). A marginal vessel or vessels (Plate 2, fig. E) were found in all specimens except one.

Numbers 4245–6, 7829, 7870, 8141, 8306, 8314, 8552, 8999 showed an ectodermal ridge in the upper limbs and an ectodermal thickening in the lower limbs.

Horizon 15 (6.0–11.0 mm.)

Six specimens were examined. Blastemal condensations were present in the proximal parts of the majority of upper limb buds but none was found in any of the lower limbs.

By this horizon the upper limb 'becomes regionally subdivided into a distal hand segment and a proximal arm and shoulder region' (Streeter). The rounded proximal portion of the limb had dorsal, cephalic, and ventral aspects in a plaster reconstruction of specimen No. 3952. The flatter hand plate had lateral and medial surfaces, and dorsal and ventral borders which were continuous with each other around the caudal tip of the limb. In the hand segment the prominent ectodermal ridge extended along the ventral border and around the caudal tip on to the dorsal border (Text-fig. 1). A definite marginal vessel was present in each specimen.

According to Streeter (1948) a foot plate is present in older embryos of this horizon. In the plaster reconstruction of No. 3952 a foot plate was not distinct; the lower limb had a smaller, ventral, and a larger, dorsal surface. An ectodermal ridge, present in the lower limb for the first time, was located along the rounded ventrolateral border and crossed the blunt, ventral tip of the limb (Text-fig. 1). Marginal vessels, subjacent to a definite ridge, were present in each specimen.

Numbers 721, 3952, 6504, 6506, 8997, 9140 showed an ectodermal ridge in upper and lower limbs.

Horizon 16 (7.0–12.2 mm.)

Ten upper and nine lower limbs were studied. In the upper limb, according to Streeter (1948), the peripheral part of the hand plate now forms a thick crescentic flange, the digital plate, and 'in transparent specimens one can usually see the primary marginal vein coursing along the rim' of this plate. A plaster reconstruction of specimen No. 617 revealed that the different parts of the limb had the same orientation as in the previous horizon. The ectodermal ridge extended along the entire ventral or pre-axial, and part of the dorsal or post-axial, border (Text-fig. 1). As in previous stages, the ectodermal ridge was prominent and similarly related to the marginal vein. Blastemal condensations were present in all the upper limbs. In one specimen the humerus was just beginning to chondrify. Condensations for the radius and ulna could be identified in some instances.

In the plaster reconstruction of specimen No. 617 the lower limb had larger dorsolateral and smaller ventromedial surfaces and a distal tip. A well-marked proximodistal axis was present in the lower limb for the first time. An ectodermal ridge was sharply localized and lay more along the pre-axial border but to a considerable extent along the postaxial border as well (Text-fig. 1). On the basis of Streeter's subdivisions of the lower limb at this stage, the ridge seemed to be confined to the foot plate. The ectodermal ridge was prominent and closely related to the subjacent marginal vein (Plate 2, fig. F). A central blastemal condensation was present in the lower limbs of four specimens and was doubtful in two different ones.

In most specimens of this and other horizons the ectodermal ridge projected above the level of the adjacent ectoderm. In a few, however, it was depressed into the underlying mesenchyme and formed little, or no, surface elevation. It was noted in some specimens that the basement membrane of the ectodermal ridge was prominent and stained sharply with aniline blue, and that occasionally a clear space was present between this membrane and the mesenchyme; this space, however, may have been an artifact.

Numbers 617, 6507, 6509, 6510, 6512, 6517, 7115, 8112, 8773 showed an ectodermal ridge in upper and lower limbs (No. 163 showed a ridge in the upper limb).

Horizon 17 (8.6–14.5 mm.)

Fifteen upper and nineteen lower limbs were studied. The hand plate in this horizon is characterized by the presence of finger rays and, in the older members, by the presence of 'a crenated rim due to the projecting tips of the individual digits' (Streeter, 1948). A crenated rim and finger rays were present in a plaster reconstruction of specimen No. 6520, and the orientation of the upper limb was the same as in the previous horizon. The ectodermal ridge extended along the margin of the digital plate (Text-fig. 1). It was present in 6 specimens, absent in 4, and doubtful in 5. In those specimens in which it was present it was less

prominent than in younger ones (Plate 1, fig. D). Chondrification was present in the radius and ulna as well as in the humerus, and, in a few specimens, early chondrification of the metacarpals had begun.

The foot plate is very well demarcated in this horizon, and, according to Streeter, a digital plate can be distinguished. The foot plate of a plaster reconstruction of specimen No. 6520 had dorsolateral and ventromedial surfaces. The ectodermal ridge, which extended along the margin of the foot plate (Text-fig. 1), was still very prominent (Plate 2, fig. G) and was present in all specimens examined. Blastemal condensations for the skeletal elements of the thigh, leg, and occasionally the foot, were present. Chondrification of the femur and sometimes of the tibia was noted in some specimens.

Numbers 6520, 6521, 6742, 8101, 8253, 8998 showed an ectodermal ridge in the upper limbs; numbers 623, 5642, 5893, 6758 did not; numbers 353, 940, 6631, 8118, 9100 were doubtful. Numbers 353, 559, 623, 940, 1771, 5642, 5893, 6258, 6519, 6520, 6521, 6631, 6742, 6758, 8118, 8253, 8789, 8998, 9100 showed an ectodermal ridge in the lower limbs.

TABLE 1

Incidence of ectodermal thickening and ectodermal ridge in seventy human embryos

Horizon	Upper limbs				Lower limbs			
	Present	Doubtful	Absent	No. of specs.	Present	Doubtful	Absent	No. of specs.
11	0	0	1	1	0	0	1	1
12	6	1	0	7	0	0	1	1
13	5	0	0	5	6	0	0	6
14	8	0	0	8	8	0	0	8
15	6	0	0	6	6	0	0	6
16	10	0	0	10	9	0	0	9
17	6	5	4	15	19	0	0	19
18	0	0	8	8	5	2	1	8
19	—	—	—	0	0	0	4	4

Horizon 18 (11.7–18.0 mm.)

The ectodermal ridge was absent in the upper limbs of all eight specimens examined.

In the lower limbs Streeter (1948) observed toe rays in some specimens of this horizon. A thin ectodermal ridge (Plate 2, fig. H) was present in 5 specimens of the present series, doubtful in 2, and absent in 1.

The development of the skeletal elements had advanced further, and chondrification of some of them in the hands and feet had occurred in certain specimens.

Numbers 492, 4430, 6522, 6528, 6533, 7707, 8097, 8172 showed no ectodermal ridge in the upper limbs. Numbers 4430, 6522, 6528, 8097, 8355 showed a

flattened ectodermal ridge in the lower limbs; number 492 probably did not; numbers 7707 and 8172 were doubtful.

Horizon 19 (15.5–21.0 mm.)

In four specimens examined, numbers 4405, 5609, 6150, 8965, no ectodermal ridges were present in the lower limbs.

DISCUSSION

The upper limb bud first appears in the older members of horizon 12 (approximately 3–4 mm. greatest length, 21–29 paired somites, 25–27 ovulation days). Simultaneously an ectodermal thickening can be detected on the ventral or flexor aspect and lateral margin of the limb. In horizon 14 the lateral part of the thickening becomes the ectodermal ridge¹ which persists until horizon 17, when it is present in only some specimens. The ridge has disappeared by horizon 18. Thus it is present during approximately the fifth ovulation week, or in embryos of about 4–12 mm. greatest length.

The lower limb bud first appears in horizon 13 (4–6 mm., 27–29 ovulation days), and an ectodermal thickening on its ventral or flexor aspect and lateral margin can also be detected at this time. A ridge forms by horizon 15, persists until horizon 18, when it is present in only some specimens. The ridge has disappeared by horizon 19. Thus, the appearance and disappearance of the thickening and ridge in the lower limb lags behind those events in the upper limb by one horizon or about 2 days. The thickening and ridge are found in embryos of about 5 to 15 mm. greatest length.

By horizon 14 scattered vessels or, in some instances, a single marginal vessel (*Randvene*, Hochstetter) are found subjacent to the ectodermal thickening or ridge.

It is of interest that mesenchymal condensations for the skeleton of the upper limb may be present by horizon 15, and that at horizon 17, when the ridge is disappearing, chondrification has begun in the metacarpus of some specimens, and is more advanced in the skeleton of the arm and forearm. Apparently the ridge disappears before carpal elements begin to chondrify, and our data suggest that in those embryos in which chondrification has started in the metacarpus, the ridge has disappeared.

In the lower limb mesenchymal condensations for skeletal parts appear during horizon 16. The ectodermal ridge seems to persist longer in relation to chondrification than it does in the upper limb, for it may still be present in horizon 18 in specimens in which chondrification of the tarsus as well as the metatarsus has started. In the chick also the ectodermal ridge persists several stages beyond initial chondrification of the metatarsus (O'Rahilly & Gardner, 1956).

¹ Although the term 'ectodermal cap' has been used frequently, presumably because of the appearance seen in microscopical sections, the term 'ectodermal ridge' is preferable, since it is topographically accurate (see Text-fig. 1).

According to Martin (1929), Bischoff in 1842 was the first to describe the initial development of the limbs in mammals. It had previously been described by von Baer in the chick. The limbs arise from the lateral body-wall as swellings of the Wolffian ridge of somatopleure. As Streeter pointed out, the ectoderm over the limbs is not attenuated but rather thickens. Blechschmidt (1948, 1951) described an ectodermal ring in human embryos, part of which lies on the ventral aspect of the Wolffian ridge. Thus, when limbs first appear the ectodermal thickening is on their ventral aspects.

There seems little doubt that such ectodermal specialization is a general feature of vertebrates. Peter (1903) pointed out that an apical ridge (*Extremitäten-scheitelleiste*) is characteristic of amniotes; he found it in the lizard, chick, dog, and man, but was unable to find it in a salamander (*Necturus*). Steiner (1928) stated that an ectodermal cap is not present in amphibians, but that nevertheless the ectoderm of the developing limbs is thicker than that elsewhere on the body. Several workers (Filatow, 1928; Steiner, 1928; Balinsky, 1935) have shown that limb ectoderm in amphibians does have an important influence on the underlying mesoderm.

Saunders (1948) first clearly established the importance of the ectodermal ridge in the chick. By various experiments involving carbon marking in the wing bud and excision of the ectodermal ridge, he concluded that 'the mesoderm of the apical region of the wing bud [apical growth zone] progressively lays down mesodermal materials for the future wing parts in proximodistal sequence and in their definitive spatial pattern'. This process is dependent on 'the thickened ectoderm at the apex of the bud', which is therefore 'essential to the formation of the limb'. These experiments are important in the elucidation of developmental anomalies of the limbs, particularly the paraxial hemimelias (O'Rahilly, 1951).

Zwilling (1949) showed that the ectodermal ridge is absent in chicks which had the 'wingless syndrome'. Naujoks (1953) found that exposure of chick embryos to oxygen deficiency for a short time leads to various developmental defects; in some cases the limbs showed deficient skeletal development and lacked apical epidermal ridges.

SUMMARY

1. Serial sections of the limbs of seventy human embryos, ranging from developmental horizons 11 to 19 inclusive, were examined.

2. In the upper limb an ectodermal thickening was present on the ventral aspect and lateral border at horizon 12. The lateral part of this thickening formed the ectodermal ridge at horizon 14. The ridge disappeared during horizon 17. These events occurred one horizon later for the similar thickenings and ridges on the lower limb.

3. Changes in appearance and position of the limbs as seen in plaster recon-

structions between horizons 12 and 17 are described. The limits of the thickenings and ridges were mapped out on these reconstructions and are illustrated.

4. The significance of similar ridges in avian limbs is discussed.

REFERENCES

- BALFOUR, F. M. (1885). (The works of, ed. by Foster, M., & Sedgwick, A., vol. 3.) *A Treatise on Comparative Embryology*. Vol. 2. *Vertebrata*. London: Macmillan.
- BALINSKY, B. I. (1935). Selbstdifferenzierung des Extremitätenmesoderms im Interplantat. *Zool. Jb., Abt. allg. Zool. Physiol. Tiere*, **54**, 327-48.
- BARDEEN, C. R., & LEWIS, W. H. (1901). The development of the limbs, body-wall and back in man. *Amer. J. Anat.* **1**, 1-36.
- BLECHSCHMIDT, E. (1948). *Funktionsentwicklung I. Mechanische Genwirkungen*. Göttingen: Musterschmidt.
- (1951). Die frühembryonale Lageentwicklung der Gliedmaßen (Entwicklung der Extremitäten beim Menschen. Teil I). *Z. ges. Anat., Abt. I, Z. Anat. EntwGesch.* **115**, 529-40.
- (1951). Die frühembryonale Formentwicklung (Entwicklung der Extremitäten beim Menschen. Teil II). *Z. ges. Anat., Abt. I, Z. Anat. EntwGesch.* **115**, 597-616.
- BRAUS, H. (1906). Die Entwicklung der Form der Extremitäten und des Extremitätenskeletts. In Hertwig, O., *Handbuch der vergleichenden und experimentellen Entwicklungslehre der Wirbeltiere*. Dritter Band. Zweiter Teil, 167-338. Jena: G. Fischer.
- FILATOW, D. (1928). Über die Verpflanzung des Epithels und des Mesenchyms einer vorderen Extremitätenknospe bei Embryonen von Axolotl. *Roux Arch. EntwMech. Organ.* **113**, 240-4.
- FISCHEL, A. (1929). *Lehrbuch der Entwicklung des Menschen*. Wien und Berlin: Springer.
- HAINES, R. W. (1947). The development of joints. *J. Anat., Lond.* **81**, 33-55.
- HAMILTON, W. J., BOYD, J. D., & MOSSMAN, H. W. (1952). *Human Embryology*. 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins; Cambridge: Heffer.
- KÖLLIKER, A. (1879). *Entwicklungsgeschichte des Menschen und der höheren Thiere*. Zweite Auflage. Leipzig: W. Engelmann.
- LEWIS, W. H. (1902). The development of the arm in man. *Amer. J. Anat.* **1**, 145-84.
- MARTIN, P. (1929). *Contribution à l'étude des articulations des membres chez l'embryon humain*. Thèse, Université de Lausanne.
- NAUJOKS, H. (1953). Der Einfluß kurzfristigen Sauerstoffmangels auf die Entwicklung des Hühnchens in den ersten fünf Bruttagen. *Beitr. path. Anat.* **113**, 221-52.
- O'RAHILLY, R. (1951). Morphological patterns in limb deficiencies and duplications. *Amer. J. Anat.* **89**, 135-93.
- & GARDNER, E. (1956). The development of the knee joint of the chick and its correlation with embryonic staging. *J. Morph.* **98**, 49-88.
- PETER, K. (1903). Mitteilungen zur Entwicklungsgeschichte der Eidechse. 4. Die Extremitätenscheitelleiste der Amnioten. *Arch. mikr. Anat.* **61**, 509-21.
- SAUNDERS, J. W. (1948). The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. *J. exp. Zool.* **108**, 363-403.
- STEINER, K. (1928). Entwicklungsmechanische Untersuchungen über die Bedeutung des ektodermalen Epithels der Extremitätenknospe von Amphibienlarven. *Roux Arch. EntwMech. Organ.* **113**, 1-11.
- (1929). Über die Entwicklung und Differenzierungsweise der menschlichen Haut. I. Über die frühembryonale Entwicklung der menschlichen Haut. *Z. Zellforsch.* **8**, 691-720.
- STREETER, G. L. (1942). Developmental horizons in human embryos. Description of age group XI, 13 to 20 somites, and age group XII, 21 to 29 somites. *Contr. Embryol. Carneg. Instn.* **30**, 211-45.
- (1945). Developmental horizons in human embryos. Descriptions of age group XIII, embryos about 4 or 5 mm. long, and age group XIV, period of indentation of the lens vesicle. *Contr. Embryol. Carneg. Instn.* **31**, 27-63.
- (1948). Developmental horizons in human embryos. Descriptions of age groups XV, XVI, XVII, and XVIII, being the third issue of a survey of the Carnegie Collection. *Contr. Embryol. Carneg. Instn.* **32**, 133-203.

- STREETER, G. L. (1949). Developmental horizons in human embryos (fourth issue). A review of the histogenesis of cartilage and bone. *Contr. Embryol. Carneg. Instn.* **33**, 149-67.
- (1951). (Prepared for publication by C. H. Heuser & G. W. Corner.) Developmental horizons in human embryos. Description of age groups XIX, XX, XXI, XXII, and XXIII, being the fifth issue of a survey of the Carnegie Collection. *Contr. Embryol. Carneg. Instn.* **34**, 165-96.
- STRUBE, W. (1950). *Der Bau des Ektoderms bei menschlichen Embryonen des I. bis II. Entwicklungsmonats*. Dissertation, Göttingen.
- ZWILLING, E. (1949). The role of epithelial components in the developmental origin of the 'wingless' syndrome of chick embryos. *J. exp. Zool.* **111**, 175-87.

ADDENDA

Since this article was written the following two important papers have appeared:

- AMPRINO, R., & CAMOSSO, M. (1955). Ricerche sperimentali sulla morfogenesi degli arti nel pollo. *J. exp. Zool.* **129**, 453-93.
- HINRICHSSEN, K. (1956). Die Bedeutung der epithelialen Randleiste für die Extremitätenentwicklung. *Z. ges. Anat., Abt. I, Z. Anat. EntwGesch.* **119**, 350-64.

EXPLANATION OF PLATES

PLATE 1. UPPER LIMB

Magnifications given in Plates 1 and 2 are the original ones used in taking the photomicrographs.

FIG. A. Horizon 12. Embryo No. 5923. 4 mm. 2-3-2. $\times 200$. The upper limb bud projects at the left-hand side of the photomicrograph. The ectodermal thickening can be seen on the ventral surface and lateral margin of the limb bud. The extent of the thickening in this embryo can be assessed from Text-fig. 1.

FIG. B. Horizon 13. Embryo No. 8066. 5.3 mm. 6-4-4. $\times 100$. The upper limb bud projects at the right-hand side of the photomicrograph. The ectodermal thickening shows several layers of nuclei.

FIG. C. Horizon 14. Embryo No. 8552. 6.5 mm. 8-3-4. $\times 200$. The lateral portion of the ectodermal thickening forms a prominent elevation, the ectodermal ridge, which occupies the ventro-lateral or pre-axial border of the limb. The marginal vein can be seen adjacent to the ridge.

FIG. D. Horizon 17. Embryo No. 8998. 11 mm. 21-1-3. $\times 200$. The ectodermal ridge forms the margin of the digital plate.

PLATE 2. LOWER LIMB

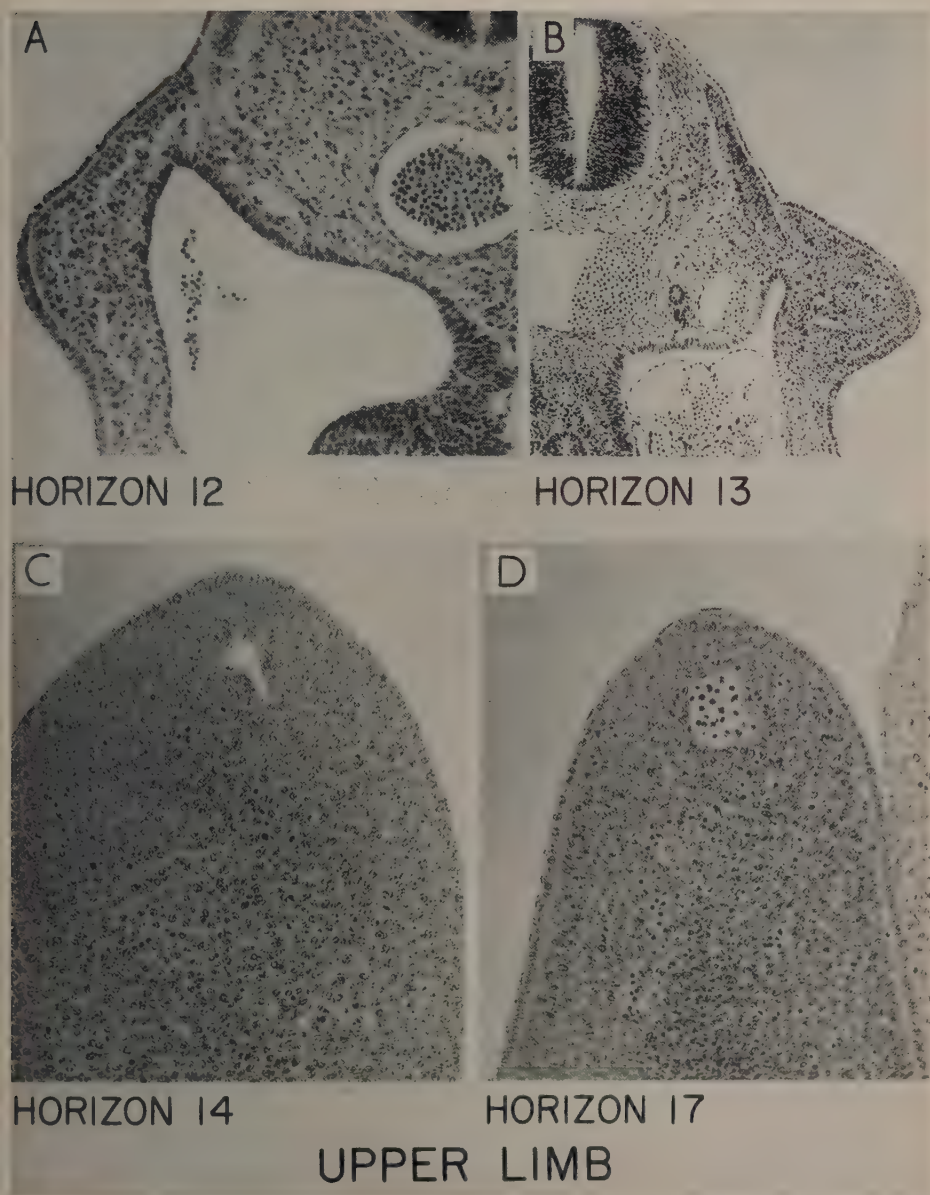
FIG. E. Horizon 14. Embryo No. 8999. 6 mm. 5-5-3. $\times 100$. The ectodermal thickening and the subjacent marginal vein can be seen in the lower limb bud.

FIG. F. Horizon 16. Embryo No. 8773. 11 mm. 11-1-4. $\times 200$. A localized ectodermal ridge and the subjacent marginal vein are evident.

FIG. G. Horizon 17. Embryo No. 8998. 11 mm. 13-1-1. $\times 200$. A prominent ectodermal ridge forms the margin of the foot plate.

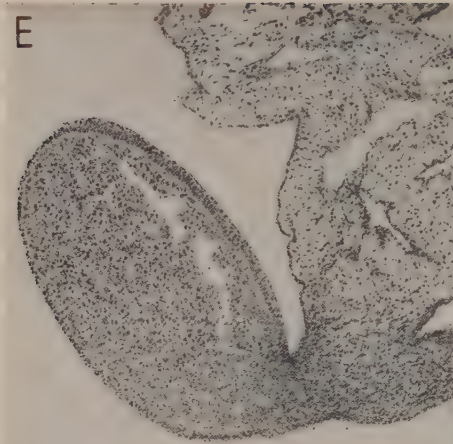
FIG. H. Horizon 18. Embryo No. 9247. 15 mm. 16-2-2. $\times 200$. A thin ectodermal ridge can be identified near the marginal vein. A skeletal condensation is present in the centre of the illustration.

(Manuscript received 10:xi:55)

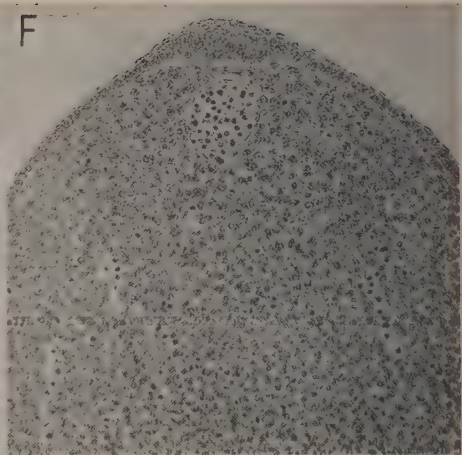


R. O'RAHILLY, E. GARDNER, & D. J. GRAY

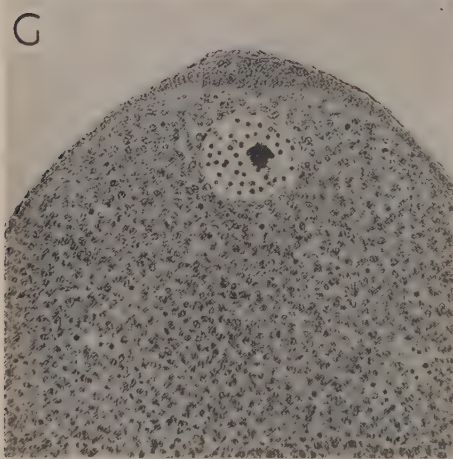
Plate 1



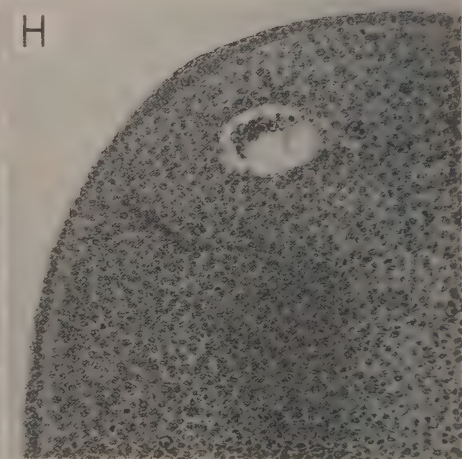
HORIZON 14



HORIZON 16



HORIZON 17



HORIZON 18

LOWER LIMB

R. O'RAHILLY, E. GARDNER, & D. J. GRAY

Plate 2

Les ions de métaux lourds et le problème de la détermination embryonnaire chez les Échinodermes

by R. LALLIER¹

Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris

INTRODUCTION

LES recherches sur l'action des ions lithium et sulfocyanure sur le développement de l'œuf d'oursin forment une importante contribution au progrès de nos connaissances dans le domaine de la détermination embryonnaire. Les effets végétativisants du lithium, découverts par Herbst (1892), confèrent à ce métal une situation assez exceptionnelle parmi les autres métaux alcalins et alcalino-terreux. En contraste, les métaux lourds présentent une toxicité généralement élevée. Leurs effets sur le développement ne sont toutefois pas uniformes et certains de ces métaux exercent une action différentielle sur les territoires embryonnaires. C'est ainsi que Waterman (1937) a observé que l'inhibition de la gastrulation s'accompagne d'un processus d'ectodermisation chez les embryons d'oursins cultivés en présence de sels de métaux lourds. Nous avons montré d'autre part, les effets animalisants très puissants des sels de zinc et de cadmium sur l'œuf de l'oursin *Paracentrotus lividus*, Lallier (1955a).

Dans ce travail, nous abordons l'étude de l'action animalisante du zinc. Dans ce but, nous comparons les effets du zinc avec ceux d'autres métaux présentant des propriétés voisines. Le nickel, le cobalt, le manganèse et le fer ont été choisis. En fonctionnant à la valence 2, ces métaux présentent de nombreux caractères communs avec le zinc.

La répartition du zinc fixé sur les embryons est examinée à divers stades du développement et dans des conditions expérimentales variées. Le métal est mis en évidence par la formation d'un complexe coloré avec la dithizone.

L'addition de substances spécifiques de groupes chimiques déterminés à des cultures faites en présence de sels métalliques a permis d'aborder le problème de la fixation des ions métalliques. L'acide p. chloromercuribenzoïque est utilisé en raison de son affinité pour les groupes sulphydriques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Ces expériences sont faites sur les œufs de l'oursin *Paracentrotus lividus*. Les œufs sont utilisés $\frac{1}{2}$ heure après la fécondation. Le volume de chaque culture est

¹ Author's address: Institut de Biologie Physico-Chimique, 13 rue Pierre Curie, Paris 5^e, France.

de 100 cc. La température est de 21 à 23° C. Des cultures de contrôle sont faites en bloquant préalablement l'ion métallique par un agent complexant, l'acide éthylènediamino-tétra-acétique (Complexone) utilisé à la concentration de 0,05/100 sous forme de sel tétrasodique. Les sels métalliques chimiquement purs (Rhône-Poulenc) sont utilisés pour la préparation des solutions stocks dans l'eau de mer: ZnCl_2 1/1 000, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1/1 000, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1/1 000, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1/1 000. Des solutions de $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ à 1/100 et à 1/1 000 dans l'eau distillée sont préparées au moment de l'emploi.

Nous rappellerons qu'en ce qui concerne la solution de ZnCl_2 dans l'eau de mer, 60 pour cent du Zn précipite sous forme d'hydroxyde insoluble. La concentration réelle de la solution ne représente que 40 pour cent de la concentration théorique. Par mesure d'homogénéité les valeurs des concentrations sont indiquées en fonction de la dilution de la solution à 1/1 000.

Pour la détection des métaux dans les embryons nous utilisons des réactifs organiques donnant une réaction colorée caractéristique. Les indications détaillées sur ces réactifs et leur mode d'emploi figurent dans l'ouvrage de Bernot (1947). La détermination des métaux est faite sur lame creuse en mélangeant 3 gouttes d'une suspension d'embryons avec 1 goutte de réactif correspondant au métal recherché. Les réactifs suivants préparés au moment de l'emploi sont utilisés:

Zinc: solution saturée de dithizone dans l'alcool à 70°.

Nickel: solution alcoolique de diméthylglyoxime à 1 pour cent, solution alcoolique de α -fural-dioxime à 2 pour cent.

Mercure: solution saturée de diphénylcarbazone dans l'alcool à 90°.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Sels métalliques et développement

Tous les métaux sont utilisés à l'état bivalent. Ce sont les chlorures de nickel, de cobalt, de manganèse et le sulfate ferreux.

Chlorure de nickel. 11 séries expérimentales complètes ont été effectuées avec des résultats constants d'une série à l'autre.

Dans les solutions à 1/1 000, le développement est retardé. Après 23 heures, les embryons sont au stade blastula, 50 pour cent sont éclosés. L'épaississement apical est peu marqué et recouvert de cils courts. Après 48 heures, tous ces embryons sont éclos. Ils sont sphériques avec des parois très minces. L'archentéron, les spicules et les cellules pigmentaires manquent. Deux groupes cellulaires opacifiés, étalés à la face interne de l'embryon, l'un au pôle animal, l'autre au pôle végétatif, sont tantôt isolés, tantôt réunis par une travée cellulaire opaque. On trouve en outre quelques rares gastrulas munies d'une petite vésicule archentérique. Celle-ci se désintègre le jour suivant et est remplacée par un groupe de cellules opacifiées. Ces embryons laissés 5 ou 6 jours dans la solution ne s'y développent pas et leur taille diminue sensiblement. Reportés dans l'eau

de mer après un séjour de 23 heures seulement, ils prennent l'aspect que nous venons de décrire. Ils sont tous lysés le lendemain de leur transfert.

Dans les solutions à 1/5 000, le ralentissement du développement est moins accentué. Dans les cultures de 23 heures, toutes les blastulas sont écloses. Elles sont légèrement allongées selon leur axe animal-végétatif et leurs contours sont plissés. L'épaississement ectodermique apical est peu marqué et recouvert de cils courts. Une petite ébauche archentérique est formée chez de nombreux embryons. Les spicules manquent. Observés 24 heures plus tard, ces embryons se signalent par une légère extension en forme de lobe de la zone apicale. L'ectoderme est épaissi à ce niveau et recouvert de cils courts. Le pôle anal est entouré par une bande d'ectoderme épaissie recouverte de cils courts. L'archentéron est encore réduit à une petite vésicule. Les cellules mésenchymateuses sont rares et opacifiées. Les spicules et les cellules pigmentaires manquent. Ces embryons peuvent être laissés dans la solution pendant plusieurs jours, souvent une semaine, tout en restant parfaitement viables, mais ils présentent alors une régression caractéristique. Les parois et les zones ciliées s'amincissent progressivement. L'archentéron se désintègre et il est remplacé par un groupe de cellules opacifiées. L'embryon tend à devenir sphérique, ses parois s'amincissent considérablement. C'est à peine si l'on remarque un léger épaississement au pôle apical et au niveau de la bande ciliée anale. Ces phénomènes s'accompagnent d'une diminution souvent considérable et d'ailleurs variable de la taille de l'embryon. Voici les mesures en μ des diamètres de différents embryons dans une culture de 5 jours: 128, 106, 96, 85, 75, 54, 43, et 32. Les plus petits de ces embryons sont compacts et opaques. La survie relativement prolongée de ces embryons contraste avec leur faible viabilité lorsqu'ils sont transférés dans l'eau de mer après 23 heures seulement de culture dans les solutions de NiCl_2 . Ils se lysent en effet sans se développer, quelques heures après leur report dans l'eau de mer.

Dans les solutions à 1/10 000, les embryons après 48 heures ressemblent à ceux développés dans les solutions à 1/5 000. Ils en diffèrent par leur archentéron mieux développé et la présence de spicules pairs, épineux. Reportés dans l'eau de mer après 23 heures de séjour dans la solution de NiCl_2 , ils conservent cet aspect général et leur archentéron se différencie en trois segments. Ils se lysent d'ailleurs rapidement après ce transfert.

Dans les cultures de contrôle en présence de Complexone (NiCl_2 1/5 000 et Complexone 0,05/100), le développement est normal.

Dans les solutions plus diluées 1/50 000 et 1/100 000, le retard du développement est peu sensible. Les pluteus ont un lobe oral très développé, bordé d'un ectoderme épais recouvert de longs cils. Les bras anaux manquent (1/50 000) ou sont rejetés latéralement de part et d'autre du lobe oral (1/100 000). La région sommitale peu développée est arrondie. Les trois segments de l'archentéron sont formés. La bouche est présente à la base du lobe oral, moins fréquemment toutefois dans les solutions à 1/50 000. A cette concentration, les spicules au nombre de 3 ou 4 en général, très épineux, enchevêtrés, forment une

couronne entourant la base de l'archentéron. Les embryons restent viables plus longtemps dans les solutions à 1/100 000, mais ils régressent progressivement atteignant après une semaine le tiers ou la moitié de leur taille initiale.

Chlorure de Cobalt. Cinq séries d'expériences ont été faites. Peu de différences ont été observées entre chaque série.

Dans les solutions à 1/5 000, le développement est ralenti. Après 24 heures, ces cultures ne contiennent encore que de jeunes gastrulas, pour la plupart en voie d'éclosion, tandis que les témoins sont déjà de petits pluteus. Des embryons restent bloqués aux stades morula et blastula. Leur pourcentage varie selon les pontes, mais il ne dépasse guère 10 pour cent du total.

Dans les cultures de 48 heures, toutes les gastrulas sont écloses. Elles portent au pôle végétatif de nombreuses expansions en forme de bourgeons épais recouverts de cils courts. Partout ailleurs, les parois sont minces et recouvertes de cils courts, même au pôle animal. L'archentéron est réduit à une petite vésicule. Les cellules pigmentaires sont tassées à la base de cet archentéron. Les spicules manquent. Chez quelques rares gastrulas, l'ectoderme apical est plissé. L'archentéron plus développé s'étend jusqu'au pôle animal. Ces embryons sont peu mobiles et leur viabilité est faible. Ils sont tous lysés après 3 jours de culture. Leur transfert dans l'eau de mer, après un séjour limité à 23 heures, améliore leur développement. Les embryons prennent alors une structure prismatique plus ou moins marquée. Le tube digestif se différencie en trois segments. Les spicules, au nombre de 3 ou 4, sont petits et épineux. On rencontre en outre de rares formes pluteïques avec un lobe oral hyperdéveloppé et des bras anaux réduits. Tous ces embryons sont peu viables et ils ne peuvent être cultivés plus longtemps que ceux laissés dans la solution de CoCl_2 .

Dans les cultures de contrôle, en présence de Complexone (CoCl_2 1/5 000 + Complexone 0,05/100), le développement est normal.

Aux concentrations 1/10 000 et 1/50 000, le retard du développement est peu sensible. Ces pluteus de petite taille ont une forme générale globuleuse. Les bras anaux et le lobe oral sont peu développés. La bouche manque (1/10 000). Les spicules sont épineux.

Reportés dans l'eau de mer après un séjour de 23 heures, ces embryons se développent en pluteus avec des bras anaux irrégulièrement orientés. Les spicules sont épineux. La bouche est présente.

Chlorure de manganèse. Trois cultures ont été faites avec le chlorure de manganèse. Dans les solutions à 1/5 000, le développement est très légèrement ralenti. Dans les cultures de 48 heures le développement des bras anaux et de la partie sommitale est inhibé. Chez 50 pour cent des embryons la bouche n'est pas formée. Les autres sont des pluteus de structure normale, plus petits que les témoins.

Dans les solutions à 1/10 000, les embryons ne se distinguent guère des témoins. Seuls quelques uns présentent une légère inhibition du développement de la partie sommitale et des bras anaux.

Sulfate ferreux. Trois cultures ont été faites avec le sulfate ferreux. Une partie appréciable du fer précipite à l'état d'hydroxyde diminuant ainsi la concentration effective des ions Fe^{++} . En outre l'oxydation de la solution par l'oxygène de l'air provoque la transformation rapide des ions ferreux en ions ferriques. En raison de ces considérations, les résultats indiqués ne présentent qu'un intérêt d'orientation.

Avec une concentration de 1/1 000, le développement est ralenti et la plupart des embryons ne dépassent pas le stade morula. Quelques rares pluteus se développent. Ils sont petits et ne dépassent pas les $\frac{3}{4}$ ou même la $\frac{1}{2}$ de la taille des témoins. L'abondance des cellules mésenchymateuses leur donne un aspect opaque.

Dans les solutions à 1/100 000, la gastrulation est retardée, mais les pluteus sont de taille et de structure normales.

Détermination du zinc et du nickel

La répartition du zinc est examinée au cours de l'animalisation et à différents stades du développement normal. La fixation du zinc sur des embryons préalablement végétativisés par le chlorure de lithium et les effets du Complexone et des ions mercuriques sur la répartition du métal sont également étudiés.

Les œufs vierges, laissés de $\frac{1}{2}$ à 12 heures dans une solution de ZnCl_2 à 1/10 000, développent une coloration rose en présence de dithizone. De légères différences sont observées entre les œufs d'une même ponte. Elles disparaissent avec la prolongation du traitement sans que celle-ci s'accompagne d'un accroissement marqué de la coloration.

Des œufs mis dès la fécondation dans une solution de ZnCl_2 à 1/10 000 sont prélevés au cours de leur développement et traités à la dithizone. Au stade 2 blastomères, la coloration rose peu intense est également répartie entre les 2 blastomères. L'intensité de la coloration s'accroît aux stades 32 et 64 blastomères tout en restant uniformément répartie. Ces embryons reportés dans l'eau de mer normale s'y développent. Au stade prismatique la coloration est repérée dans le mésenchyme primaire et secondaire et, à un moindre degré, dans les parois de l'archentéron. La coloration n'a pu être détectée dans les pluteus.

Les embryons laissés dans la solution de ZnCl_2 jusqu'au stade blastula sont fortement animalisés. L'extension de la touffe ciliée apicale correspond au type $\frac{3}{4}$ selon la terminologie de Hörstadius (1935). La coloration est intense au niveau des cellules mésenchymateuses. La coloration des parois ectodermiques est plus faible et apparaît uniformément répartie. Ces blastulas animalisées peuvent survivre quelques jours après leur transfert dans l'eau de mer normale. On observe alors une atténuation de la coloration par la dithizone, mais sa répartition n'est pas modifiée.

Des concentrations plus faibles ont été utilisées. Dans les solutions à 1/100 000, la coloration reste très faible pendant toute la segmentation. Le développement

ne dépasse pas le stade gastrula. Celles-ci portent au pôle végétatif de nombreuses expansions ciliées de la paroi. La coloration, générale à ce stade, est plus accentuée au niveau de ces expansions.

Dans une seconde série d'essais, les embryons choisis à un stade déterminé sont mis dans une solution de chlorure de zinc à 1/10 000, puis lavés et traités par la dithizone. La durée du séjour dans les solutions est variée. Elle est toutefois limitée avec les séjours trop prolongés, par la généralisation de la coloration et par la toxicité plus forte du Zn pour les stades avancés. Les séjours relativement courts nous ont donné les indications les plus suggestives sur l'aptitude des diverses parties de l'embryon à fixer le Zn.

Chez les blastulas rondes, munies de leur mésenchyme primaire, une coloration rose se développe au niveau de ce mésenchyme et dans une étroite zone au pôle végétatif, après 30 minutes de séjour dans la solution de ZnCl_2 . Cette répartition de la coloration est conservée chez les embryons traités pendant 2 heures. Après un séjour de 4 heures ou plus, la coloration s'étend à tout l'embryon, elle reste néanmoins plus intense au niveau du mésenchyme.

Chez la gastrula avancée, un séjour de 10 minutes est suffisant pour que la coloration se développe au niveau du mésenchyme secondaire. Après 2 heures de traitement, la coloration s'étend au mésenchyme primaire et avec moins d'intensité toutefois aux parois de l'archentéron et à la périphérie du blastopore. Après 4,30 heures, la coloration s'étend à tout l'embryon. Elle reste plus marquée dans les mésenchymes et dans l'archentéron. La prolongation du traitement entraîne l'extension de la coloration à tout l'embryon.

La répartition de la coloration est semblable chez les jeunes stades prismatiques.

Chez les pluteus, après un séjour de 10 minutes à 2 heures, la coloration n'apparaît que dans les cellules pigmentaires à l'exclusion de toute autre région.

La répartition du zinc chez des embryons préalablement végétativisés par le chlorure de lithium est également examinée. Les embryons végétativisés sont obtenus en traitant les œufs fécondés, pendant 16 heures, dans la solution suivante: eau de mer 95 cc., LiCl (0,65 M) 5 cc. Ces embryons sont formés d'une petite vésicule ectodermique à parois minces et contours anguleux, contenant deux spicules ramifiés, des cellules pigmentaires et mésenchymateuses et d'un entoderme volumineux. Celui-ci complètement évaginé est formé de trois segments à parois épaisses correspondant respectivement à l'intestin antérieur, moyen et postérieur. Après un séjour de 10 minutes dans ZnCl_2 à 1/10 000, la coloration ne se développe qu'au niveau des cellules mésenchymateuses. Après 1 heure de séjour, les parois de l'entoderme apparaissent colorées, la coloration est plus accentuée au niveau du segment correspondant à l'intestin antérieur et plus faible dans le segment intermédiaire. Le segment postérieur ou anal n'est pas coloré. Le séjour des embryons dans la solution de ZnCl_2 ne peut guère être prolongé davantage car ils ne tardent pas à se lyser.

Dans ces recherches, les embryons sont lavés plusieurs fois à l'eau de mer

avant d'être traités par la dithizone. Nous avons également fait des lavages avec une solution de Complexone (1 pour cent) dans l'eau de mer. Ces deux méthodes de lavage donnent des résultats identiques.

Le problème du déplacement du zinc par certains métaux lourds étant lié par son aspect technique aux questions étudiées dans ce paragraphe, nous l'examinerons maintenant.

L'ion mercurique a été utilisé en raison de la grande stabilité de ses complexes avec les protéines. A cet effet des embryons ayant séjournés dans une solution de ZnCl_2 à 1/10 000 sont lavés et mis pendant 10 à 20 minutes dans une solution de HgCl_2 à 1/20 000. Après lavage, la coloration développée en présence de dithizone est orange très faible. Par contre, le mercure est facilement mis en évidence grâce à la coloration lie de vin qu'il développe en présence de diphénylcarbazone. Cette expérience peut être faite à tous les stades, mais les jeunes stades en cours de segmentation s'y prêtent tout particulièrement en raison de leur sensibilité plus faible à l'action lytique de l'ion mercurique.

Pour la détermination du nickel, les conditions sont moins favorables; les réactifs, l' α -furil-dioxime surtout, entraînant une opacification rapide des embryons. Aussi nous avons limité nos essais aux embryons sphériques développés dans les solutions de NiCl_2 à 1/1 000.

En présence de diméthylglyoxime, une coloration rose assez faible est repérée au niveau des cellules mésenchymateuses. L' α -furil-dioxime donne le même résultat. La détection du nickel est peu aisée dans ces conditions. Jusqu'ici seule la réaction au niveau des cellules mésenchymateuses se montre nettement positive. Il ne peut encore être décidé avec certitude s'il se fixe en d'autres régions.

Chlorure de zinc et acide p. chloromercuribenzoïque

Dans les cultures contenant ZnCl_2 à 1/10 000 et de l'acide p. chloromercuribenzoïque ($0,5 \times 10^{-5}$ M), la quasi totalité des embryons est bloquée aux stades 32 et 64 blastomères. On trouve en outre quelques rares blastulas à parois épaisses. Transférées dans l'eau de mer normale, elles se lysent sans se développer davantage.

En présence de ZnCl_2 à la concentration 1/10 000, tous les embryons sont des blastulas hyperciliées. Dans les solutions d'acide p. chloromercuribenzoïque ($0,5 \times 10^{-5}$ M) les embryons sont petits et globuleux. Le développement des bras est inhibé. L'archentéron est formé mais la bouche manque.

DISCUSSION

Les sels métalliques étudiés exercent des effets différents sur le développement de l'œuf de *Paracentrotus lividus*. Le développement est inhibé, de façon peu caractéristique, en présence de MnCl_2 et de SO_4Fe . CoCl_2 se montre plus toxique. A la concentration 1/5 000, la gastrulation est notablement perturbée.

Les effets du chlorure de nickel apparaissent plus caractéristiques. Dans les solutions à 1/1 000, l'archentéron ne se forme pas et l'entoderme s'intègre aux

parois de l'embryon par un processus d'ectodermisation déjà signalé par Waterman (1937). Il ne s'agit toutefois pas d'une animalisation typique puisque l'on n'observe ni accroissement de l'épaississement apical, ni extension de la touffe ciliée apicale. Celle-ci est d'ailleurs formée de cils courts. Dans les solutions plus diluées, les embryons présentent les caractères d'une organisation à symétrie radiale.

Les ions des métaux lourds sont responsables de l'action de ces sels métalliques sur le développement. Cette constatation découle des expériences montrant que le Complexone supprime les effets des sels de nickel et de cobalt. Nous avons également observé ce phénomène avec le chlorure de zinc (Lallier, 1955a). Les embryons sont soustraits à l'action de l'ion métallique, celui-ci étant masqué dans le complexe formé avec le Complexone.

Si l'on compare les effets du nickel avec ceux du zinc, on remarque des différences importantes. Le zinc est plus toxique que le nickel pour l'œuf d'oursin. En effet à la concentration 1/1 000, la segmentation est normale avec NiCl_2 , elle est bloquée aux stades 16 et 32 avec ZnCl_2 .

Le zinc est un agent animalisant très efficace. Avec ZnCl_2 à la concentration 1/10 000, tous les embryons sont des blastulas hyperciliées. L'extension de la touffe ciliée apicale correspond au type $\frac{3}{4}$ selon la terminologie de Hörstadius. Dans les solutions de NiCl_2 à 1/10 000, aucune blastula ne présente d'hyperdéveloppement de la plaque et de la touffe ciliée apicales.

Enfin les embryons cultivés dans les solutions de ZnCl_2 à 1/500 000 présentent un type d'organisation à symétrie radiale¹ analogue à celui des embryons développés dans les solutions de NiCl_2 à 1/5 000 et 1/10 000. L'existence d'une telle similitude, malgré la différence énorme des concentrations en sels métalliques, met en évidence l'activité plus élevée du zinc sur le développement.

Cette tendance à la radialisation des embryons a également été observée avec d'autres substances: détergents (Gustafson & Sävhaugen, 1950); 8-chloroxanthine (Hörstadius & Gustafson, 1954); colorants sulfoniques (Lallier, 1955b), persulfate de sodium (Lallier, 1955c). Avec ces colorants et le persulfate notamment, nous avons pu obtenir un effet animalisant avec des concentrations relativement élevées et un effet radialisant avec des concentrations plus faibles. Il apparaît donc que ces agents peuvent exercer une action animalisante ou radialisante selon la concentration utilisée. Le nickel et le zinc en sont un autre exemple.

Nous avons également signalé que les embryons cultivés de façon permanente dans les solutions de NiCl_2 subissent une diminution progressive de taille. Ce phénomène se présente également avec le persulfate de sodium et à un moindre degré avec ZnCl_2 et les colorants sulfoniques. La diminution de taille apparaît liée à la survie relativement longue des embryons dans ces conditions. Différents des pluteus, ces embryons en raison de leur structure ne peuvent se nourrir aux dépens des éléments du milieu. Après l'épuisement de leurs réserves vitellines,

¹ Dans un travail paru depuis l'envoi de ce mémoire, Rulon (*Biol. Bull. Wood's Hole*, 1955, **109**, pp. 316-27) a observé la radialisation des larves de Sand Dollar traitées par le chlorure de zinc.

l'attaque de certaines structures par les enzymes cellulaires apparaît nécessaire pour fournir l'énergie indispensable à leur survie. Ce phénomène rendrait compte de la régression générale de la taille de ces embryons. Ces considérations impliquent que chez ces embryons animalisés certaines structures restent accessibles à l'attaque des enzymes cellulaires et que celles-ci conservent leur pleine activité. L'étude de ces phénomènes est susceptible d'apporter des indications intéressantes sur le métabolisme et la structure de ces embryons.

Les ions de métaux lourds constituant les agents responsables des transformations morphologiques observées, l'analyse de leur mode d'action implique l'étude de leur répartition dans l'embryon et la détermination de la nature du support chimique responsable de leur fixation.

Nous avons examiné la répartition du zinc à divers stades du développement embryonnaire et dans des conditions variées. La méthode utilisée pour la détermination du zinc est basée sur la coloration pourpre qu'il donne avec la dithizone. Cette méthode a permis à Fujii (1954) de détecter le zinc dans le nucléole de l'oocyte d'oursin. Récemment Meier & Kaunat (1954) l'ont utilisée pour la mise en évidence du zinc dans le pancréas.

L'emploi de cette méthode appelle toutefois quelques remarques. Il apparaît en effet peu probable que la totalité du zinc puisse être mise en évidence dans ces conditions. Nous avons pu remarquer notamment que le complexe formé *in vitro* entre le zinc et le Complexone ne donne pas la coloration avec la dithizone. Des essais préliminaires nous ont montré qu'en présence de certains acides aminés, la coloration est plus ou moins atténuée. L'histidine, la glycine, la proline, la sérine, l'isoleucine, la thréonine, l'asparagine et l'acide aspartique se sont montrés particulièrement actifs à cet égard. Or le zinc forme des complexes assez stables avec l'histidine, ainsi d'ailleurs qu'avec d'autres acides aminés (Tanford, 1952; Albert, 1952; Perkins, 1953). Il apparaît donc que le zinc engagé dans certaines formations complexes ne peut être mis en évidence par la dithizone.

Nous ferons remarquer en outre, que l'addition de la solution alcoolique de dithizone provoquant des phénomènes de dénaturation protéiques, ceux-ci peuvent influencer à leur tour sur la fixation des ions zinc, soit dans le sens d'une libération, soit au contraire dans le sens d'un accroissement de fixation du métal. Cette seconde éventualité est plausible et nous avons pu vérifier *in vitro* que le chauffage de l'ovalbumine en présence de traces de zinc entraîne une forte diminution de la coloration par la dithizone. Le renforcement de l'affinité de la protéine dénaturée pour le métal et l'accroissement de la stabilité des complexes formés apparaissent responsables de ce phénomène.

Ces remarques, tout en restreignant la possibilité de mettre en évidence par cette méthode la totalité du zinc fixé, ne touchent toutefois en rien la possibilité de détecter le métal engagé dans certaines combinaisons. Sans préjuger de la nature de ces combinaisons, nous ferons remarquer qu'un lavage préalable à l'eau ou avec une solution de Complexone n'empêche pas le développement de la coloration. Nous avons rendu compte de l'augmentation de l'intensité de la

coloration au cours du développement. Ce phénomène indique une fixation croissante de zinc et le stade blastula marque à cet égard un maximum. L'étude de la répartition de la coloration à diverses étapes du développement ainsi que chez les embryons végétativisés, indique d'une part une affinité plus grande du métal pour les régions végétatives et, d'autre part la diminution progressive de la fixation du métal avec les progrès de la différenciation. Nous avons vu que chez les pluteus, seules les cellules pigmentaires donnent une réaction colorée à la dithizone. Aux stades avancés du développement, les structures entodermiques dérivées du matériel initialement le plus végétatif sont également les plus sensibles aux effets toxiques du zinc; elles sont toujours lésées les premières. Un séjour prolongé dans la solution de ZnCl_2 entraîne l'extension de la fixation du zinc à tout l'embryon, et ce phénomène va de pair avec la généralisation de l'effet toxique du métal. Le zinc présente donc une grande affinité pour les régions végétatives, et ce phénomène est susceptible de rendre compte de l'orientation de leur développement en direction animale.

Une situation analogue se présente dans le cas du nickel. Bien que les recherches aient été plus limitées, nous avons pu remarquer dans les blastulas la haute affinité du métal pour le mésenchyme. Il n'a pas été possible de mettre en évidence de réaction colorée dans les parois ectodermiques. Ces résultats indiquent une affinité assez faible du nickel pour les tissus embryonnaires et s'accordent avec les effets morphogènes moins marqués et la toxicité moins élevée de ce métal.

La fixation des ions métalliques sur les structures embryonnaires apparaissant ainsi responsable de leurs effets sur le développement, nous examinerons maintenant les différents supports chimiques présentant une affinité pour ces ions. Malgré les nombreux travaux consacrés à ce sujet, nos connaissances sur la nature et la stabilité des complexes formés avec les ions métalliques sont encore très restreintes. Ces problèmes ont fait l'objet de revues d'ensemble où le rôle physiologique de ces complexes est particulièrement examiné (Lehninger, 1950; Williams, 1953). L'ouvrage de Martell & Calvin (1952) traite des différents aspects de la chimie des complexes. Dans les conditions physiologiques, les ions forment des complexes avec de nombreuses substances jouant un rôle physiologique important, protéines, acides aminés, peptides, acides organiques et divers composés phosphorylés. Cette énumération n'est d'ailleurs pas exclusive. Nous ne considérerons ici que les complexes formés avec les protéines. En contraste avec les ions de métaux alcalins et alcalino-terreux, les ions de métaux lourds forment avec les protéines des complexes de stabilité élevée dans les conditions physiologiques normales. En général l'ordre de stabilité de ces complexes est pour les métaux étudiés ici: $\text{Mn}^{++} < \text{Fe}^{++} < \text{Co}^{++} < \text{Ni}^{++} < \text{Cu}^{++} < \text{Zn}^{++}$. La nature des groupes fonctionnels des protéines responsables de la fixation varie selon la nature de ces ions. Pour le zinc, la fixation est possible avec tous les groupes fonctionnels. Elle dépend toutefois de la concentration et de l'affinité relative du métal pour chaque groupe fonctionnel. C'est ainsi qu'à faible

concentration le zinc se lierait essentiellement aux groupes SH. Aux concentrations plus élevées, la fixation s'étend aux autres groupes.

Il est néanmoins possible de distinguer une affinité particulière pour certains groupes. Le zinc présente une affinité élevée pour les résidus histidine, Gurd & Goodman (1952). Les recherches sur les différents types de complexes métalliques ont montré que le nickel et le cobalt à l'état divalent présentent tous deux une affinité pour les composés azotés et oxygénés du type acides aminés. Le fer divalent présente en outre une affinité pour les groupes carboxyles. L'affinité pour les groupes carboxyles prédomine dans le manganèse.

Nous avons abordé l'étude de la détermination des groupes responsables de la fixation des ions zinc et l'emploi de substances présentant pour les protéines une affinité supérieure à celle des ions zinc s'est ainsi montré utile.

Nous basant sur le fait que les protéines forment avec l'ion mercurique des complexes plus stables qu'avec le zinc, nous avons examiné l'effet de cet ion sur la répartition du zinc dans l'embryon. Nous avons observé que le mercure déplace le zinc de ses combinaisons organiques dans l'embryon. Cette constatation nous indique que le mercure et le zinc ont des points de fixation communs. Il est intéressant de rappeler ici que Lindahl (1936) a montré qu'un très court passage de l'œuf de l'oursin dans une solution de $HgCl_2$ à 1/90 000 est suffisant pour provoquer l'animalisation. Il apparaît donc probable qu'en raison de la courte durée de ce traitement et de la faible concentration utilisée, la fixation de l'ion mercurique est restée limitée à certains groupes fonctionnels. Un traitement prolongé entraînant la fixation du mercure à tous les groupes fonctionnels disponibles empêche tout développement.

Afin de déterminer si la fixation du zinc sur les groupes sulfhydriles joue un rôle dans l'animalisation, nous avons utilisé l'acide p. chloromercuribenzoïque en raison de son affinité élective pour ces groupes (Hellerman, Chinard, & Deitz, 1943). Les embryons cultivés en présence de chlorure de zinc sont très sensibles à l'acide p. chloromercuribenzoïque et le développement est bloqué au cours de la segmentation. Il y a donc addition des effets toxiques et l'embryon n'est pas protégé contre les effets toxiques du zinc par l'acide p. chloromercuribenzoïque. Celui-ci utilisé seul ne provoque d'ailleurs aucune animalisation. Nous ferons également remarquer que le chlorure de zinc à très faible concentration provoque seulement la radialisation. L'affinité du métal pour les groupes sulfhydriles étant plus grande que pour les autres groupes, il apparaît ainsi que la fixation du zinc sur les groupes sulfhydriles prédomine dans ces conditions. Nous avons d'autre part remarqué que le cadmium bien que formant des complexes plus stables que le zinc avec les groupes sulfhydriles est un agent animalisant moins efficace que le zinc (Lallier, 1955a). Il apparaît donc peu probable que la fixation du zinc sur les groupes sulfhydriles joue un rôle déterminant dans l'animalisation.

L'analyse de l'action de divers oxydants et de l'acide p. chloromercuribenzoïque sur le développement de l'œuf d'oursin nous a d'ailleurs conduit à une conclusion analogue (Lallier, 1955c).

La fixation du zinc sur les groupes sulfhydriles n'apparaissant pas jouer un rôle déterminant dans l'animalisation, il reste néanmoins d'autres groupes nombreux et variés capables de fixer le zinc et de se trouver ainsi à l'origine de son action sur la détermination embryonnaire.

À cet égard les groupes basiques, aminés notamment, présentent un intérêt particulier. Ils sont en effet très répandus, et ils forment facilement des complexes avec certains métaux lourds. Nous ferons remarquer ici que des colorants sulfoniques sont d'actifs agents animalisants (Lallier, 1955*b*). Or ces colorants possédant, grâce à leurs groupes sulfoniques acides, une affinité particulière pour les groupes basiques cellulaires, le rôle de ces groupes dans ces phénomènes d'animalisation apparaît fort probable.

Le blocage des groupes fonctionnels des chaînes latérales est à l'origine d'importants changements dans les propriétés et la structure des protéines. En effet les relations d'association des protéines entre elles et avec d'autres éléments cellulaires étant largement conditionnées par la nature, le nombre et la position de ces groupes, leur blocage entraîne d'importantes conséquences sur ces phénomènes d'association. Ceux-ci jouant sans aucun doute un rôle important au cours du développement (Frey-Wyssling, 1948), on conçoit ainsi l'efficacité de certains métaux lourds sur les processus de la détermination embryonnaire. La position des ions à l'égard des problèmes de structure apparaît d'ailleurs remarquable. D'une part les ions de métaux alcalins et alcalino-terreux, au rôle physiologique essentiel, peu aptes à former des complexes avec les protéines 'dynamisent les structures' grâce à leur haute capacité d'échange. D'autre part, les ions de métaux lourds en formant des complexes à stabilité élevée avec les protéines introduisent un facteur d'inertie dans la vie cellulaire, interférant ainsi dans l'édification et le renouvellement permanent des structures au cours du développement.

L'étude du mode d'action des ions de métaux lourds offre ainsi une voie d'accès à l'analyse de la détermination embryonnaire. L'analyse du mode d'action du zinc et du nickel notamment par la comparaison de leurs effets et de leur aptitude intrinsèque à former des complexes jointe à l'étude de leur répartition dans les différentes structures cellulaires apparaît comme une voie nouvelle pour l'étude du déterminisme de l'animalisation.

RÉSUMÉ

Les effets animalisants du zinc sur le développement de l'œuf d'oursin *Paracentrotus lividus* sont étudiés et comparés avec les effets d'autres métaux présentant des propriétés voisines: Ni, Co, Mn et Fe.

Avec le chlorure de nickel (1/1 000) la formation de l'archentéron est supprimée. Les blastulas sont couvertes de cils courts. La touffe ciliée apicale n'est pas formée.

Avec le chlorure de nickel (1/5 000 et 1/10 000) les embryons présentent une organisation à symétrie radiale.

Avec le chlorure de cobalt, la gastrulation est perturbée et le développement est inhibé.

Le zinc est mis en évidence dans les embryons traités à différents stades du développement par la coloration rouge qu'il développe en présence de dithizone. Le métal est réparti dans le mésenchyme et dans l'entoderme chez les jeunes stades. Dans les pluteus le zinc apparaît fixé dans les cellules pigmentaires.

Le nickel est détecté par les réactions colorées qu'il donne avec la diméthylglyoxime et avec l' α -furil-dioxime. Le nickel est mis en évidence dans le mésenchyme de la jeune blastula.

La réaction colorée donnée par la dithizone en présence du zinc n'est pas modifiée par des lavages préalables avec une solution de Complexone. Le zinc fixé sur les embryons peut être déplacé par les ions mercuriques.

L'acide *p*. chloromercuribenzoïque bloque le développement des embryons cultivés en présence de chlorure de zinc. Les groupes sulfhydryles n'apparaissent pas jouer un rôle essentiel dans l'animalisation par le zinc.

Le rôle du zinc dans l'animalisation de l'œuf d'oursin est discuté en fonction de la formation de complexes entre le métal et les protéines.

SUMMARY

The animalizing effects of zinc on the development of eggs of the sea-urchin, *Paracentrotus lividus*, were studied and compared with the effects of other closely related metals: nickel, cobalt, manganese, and iron.

Nickel chloride (1/1,000) suppressed the formation of an archenteron. The blastulae were covered with short cilia. The apical tuft was not formed.

Nickel chloride (1/5,000 and 1/10,000) induced the formation of radial larvae.

Cobalt chloride disturbed gastrulation and inhibited development.

Zinc was detected in the embryos at various stages of development by the formation of a deep red colour with dithizone. Zinc appeared to be distributed in the mesenchyme and entoderm of the young stages. In the pluteus, it appeared to be fixed in the pigment cells.

Nickel was located by the colour reactions with dimethylglyoxime and α -furil-dioxime. The colour was developed in the mesenchyme of the young blastula.

The colour reaction with dithizone was not modified by previous washings with Complexone (ethylene-diamine tetra-acetic acid) solution.

Zinc fixed in the embryos could be displaced by mercury ions.

With the addition of *p*-chloro-mercuribenzoic acid, the development of embryos in zinc chloride was blocked. The sulfhydryl groups do not appear to be essential for animalization by zinc ions.

The role of zinc in the animalization of sea-urchin eggs is discussed as a function of the formation of complexes between metal and proteins.

Ce travail a été effectué au Laboratoire Arago à Banyuls sur Mer (P.O.). J'adresse mes remerciements au Directeur, Monsieur le Professeur G. Petit, au

sous-Directeur, Monsieur le Docteur C. Delamare-Deboutville et à Monsieur le Docteur P. Bougis, pour les facilités de travail qu'ils m'ont procurées pendant mon séjour. L'acide p. chloromercuribenzoïque m'a été fourni par Monsieur le Professeur J. Brachet, et je lui exprime ici tous mes remerciements.

TRAVAUX CITÉS

- ALBERT, A. (1952). Quantitative studies of the avidity of naturally occurring substances for trace metals. II. Amino acids having three ionizing groups. *Biochem. J.* **50**, 690-7.
- BERNOT, J. (1947). *Réactifs organiques en analyse minérale* (par l'équipe du laboratoire de recherches de Hopkin et Williams, Ltd.). Paris: Dunod.
- FREY-WYSSLING, A. (1948). *Submicroscopic Morphology of Protoplasm and its derivatives*. London: Elsevier.
- FUJII, T. (1954). Notes on presence of zinc in nucleoli and in the sperm middle piece in some marine forms. *Annot. zool. jap.* **3**, 115-17.
- GURD, F. R. N., & GOODMAN, D. S. (1952). Preparation and properties of serum and plasma proteins. XXXII. The interaction of human serum albumin with Zn ions. *J. Amer. chem. soc.* **74**, 670-5.
- GUSTAFSON, T., & SÄVHAGEN, R. (1950). Studies on the determination of the oral side of the sea-urchin egg. I. The effects of some detergents on the development. *Ark. Zool. A* **42**, 10, 1-6.
- HELLERMAN, L., CHINARD, F. P., & DEITZ, V. R. (1943). Proteins, sulphhydryl groups and the reversible inactivation of the enzyme urease. The reducing groups of egg albumin and of urease. *J. biol. Chem.* **147**, 443-62.
- HERBST, C. (1892). Experimentelle Untersuchungen über den Einfluss der veränderten chemischen Zusammensetzung des umgebenden Mediums auf die Entwicklung der Tiere. I. Versuche an Seegeleiern. *Z. wiss. Zool.* **55**, 446-518.
- HÖRSTADIUS, S. (1935). Über die Determination im Verlaufe der Eiachse bei Seeigeln. *Pubbl. Staz. zool. Napoli*, **14**, 251-429.
- & GUSTAFSON, T. (1954). The effect of three antimetabolites on sea-urchin development. *J. Embryol. exp. Morph.* **2**, 216-26.
- LALLIER, R. (1955a). Effets des ions zinc et cadmium sur le développement de l'œuf de l'oursin *Paracentrotus lividus*. *Archives de Biologie, Liège et Paris*, **66**, 75-102.
- (1955b). Animalisation de l'œuf d'oursin par les colorants azoïques et les bleus d'aniline sulfonés. *Exp. Cell Res.* **9**, 232-40.
- (1955c). Recherches sur la détermination embryonnaire chez les Échinodermes. L'action des oxydants et de l'acide p. chloromercuribenzoïque sur le développement de l'œuf de l'oursin *Paracentrotus lividus* (sous presse).
- LEHNINGER, A. L. (1950). Role of metal ions in enzyme systems. *Physiol. Rev.* **30**, 393-429.
- LINDAHL, P. E. (1936). Zur Kenntnis der physiologischen Grundlagen der Determination im Seeigelkeim. *Acta zool. Stockh.* **17**, 179-365.
- MARTELL, A. E., & CALVIN, M. (1952). *Chemistry of metal chelate compounds*. New York: Prentice-Hall.
- MEIER, K. E., & KAUNAT, H. (1954). Histochemische Untersuchungen über das Inselzink. *Naturwissenschaften*, **11**, 261.
- PERKINS, D. J. (1953). A study of the effect of amino acid structure on the stabilities of the complexes formed with metals of group II of the periodic classification. *Biochem. J.* **55**, 649-52.
- TANFORD, C. (1952). The effect of pH on the combination of serum albumin with metals. *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 211-15.
- WATERMAN, A. J. (1937). Effect of salts of heavy metals on development of the sea-urchin *Arbacia punctulata*. *Biol. Bull. Wood's Hole*, **73**, 401-20.
- WILLIAMS, R. J. P. (1953). Metal ions in biological systems. *Biol. Rev.* **28**, 381-415.

(Manuscript received 12:xi:55)

Action de la 'dicarnitine' sur la croissance et l'ossification d'ébauches de tibias et de fémurs d'embryons de poulet cultivés *in vitro*

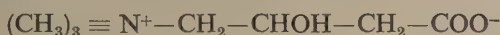
par SUZANNE LIÉBECQ-HUTTER¹

Institut d'Histologie et Laboratoire de Pathologie et
Thérapeutique Générales de l'Université de Liège

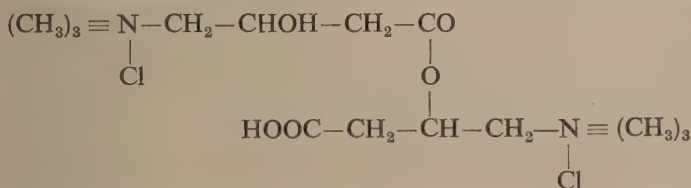
AVEC UNE PLANCHE

INTRODUCTION

LA carnitine naturelle (β -hydroxy- γ -butyrobétaïne)



découverte dans les extraits de viande (Gulewitsch & Krimberg, 1905) a été reconnue identique à la vitamine B_T présente dans l'extrait de levure ou de foie filtré sur charbon (Fraenkel & Blewett, 1947; Fraenkel, Blewett, & Coles, 1948), pour la larve de *Tenebrio molitor* par Carter, Bhattacharyya, Weidman, & Fraenkel (1952 *a* et *b*). Le dimère synthétisé (Bicarnésine Labaz) résulte de l'estérification de la fonction alcool d'une molécule de carnitine par la fonction acide d'une autre molécule (Dechamps, Buu-Hoï, Le Bihan, & Binon, 1954):



Cette 'dicarnitine' racémique a la même action vitaminique que la carnitine pour le *Tenebrio molitor* (Leclercq, 1954).

D'autre part, Leclercq (1950) avait reconnu à la vitamine T de Goetsch (1946) une action favorisant la croissance des larves de *Tenebrio molitor*. Cette vitamine T est extraite des termites et d'autres insectes ainsi que de champignons (*Penicillium*, *Torula*, *Hypomyces*). Knoth (1952) a démontré qu'elle favorise la croissance des fibroblastes de la rate de cobaye en culture, moins cependant que

¹ Author's address: Laboratoire d'Histologie et d'Embryologie de l'Université de Liège, 20 rue de Pitteurs, Liège, Belgium.

l'extrait embryonnaire. Cette préparation de vitamine T est trop impure pour l'on puisse attribuer ses effets à une substance identique à la carnitine.

La carnitine est très largement répandue dans la nature, particulièrement dans les tissus animaux (Fraenkel, 1951, 1953, 1954). L'embryon de poulet de 12 jours pesant 4 g. en contiendrait 44–88 $\mu\text{g.}/\text{g.}$ de tissu sec (Fraenkel, 1953). Son intervention n'a pu jusqu'à présent être mise en évidence chez les Vertébrés. La culture organotypique nous a permis de réaliser les conditions particulièrement favorables pour déceler l'effet de cette substance *in vitro* sur la croissance et la différenciation des ébauches de tibias et de fémurs d'embryon de poulet. En effet, la culture d'un organe tel qu'une ébauche osseuse permet de le soustraire aux diverses influences nerveuses et humorales de l'organisme. De plus, les éléments nutritifs peuvent être contrôlés. Pour mettre en évidence un facteur de croissance, il est essentiel, comme le remarque Chèvremont (1942–56), d'offrir à la culture un milieu ni trop riche ni trop pauvre: très favorable à la croissance, le milieu ne permet plus à une substance supplémentaire de montrer une action quelconque; trop déficient, l'addition de cette substance est insuffisante à rétablir une croissance normale. Cet état de carence partielle était d'autant plus nécessaire à réaliser que l'extrait embryonnaire, principal constituant du milieu de culture, contient de la carnitine comme nous venons de le préciser. Nous pouvions évidemment offrir un milieu entièrement synthétique comme l'ont fait Wolff et ses collaborateurs (1953 *a* et *b*), mais les croissances minimales, les anomalies et les pycnoses trop nombreuses que nous avons observées en l'essayant ne nous ont pas autorisée à travailler dans ces conditions qui ne correspondaient pas à nos desiderata pour cette recherche. Nous devons donc diluer l'extrait embryonnaire (20 à 200 fois). Nous avons été ainsi capable d'observer régulièrement l'effet de la 'dicarnitine' sur la croissance et sur l'ossification des ébauches osseuses *in vitro*.

Trois critères d'expériences nous ont permis d'apprécier ces effets. L'augmentation linéaire a été évaluée par des mesures pendant la culture. L'analyse de l'ossification a été faite par des mesures de l'épaisseur maximum de l'os périostique formé dans des coupes histologiques. Enfin une vaste numération des mitoses dans l'ébauche entière nous a donné un tableau du rythme de la croissance *in vitro* et de la localisation des mitoses dans les ébauches cultivées.

TECHNIQUES ET MÉTHODES

Culture des tibias et fémurs

Les ébauches de tibias et de fémurs d'embryon de poulet sont prélevées au 7^{me} jour d'incubation dans l'œuf, disséquées soigneusement et déposées à la surface du milieu solide selon la technique du verre de montre en chambre humide (Fell & Robison, 1929). Les repiquages ont lieu tous les deux ou trois jours.

La dicarnitine racémique est introduite dans le liquide de dilution entrant

dans la préparation du milieu nutritif. La solution est stérilisée au filtre Seitz. Une part aliquote de liquide de dilution entre dans la préparation des témoins correspondants.

Milieux synthétiques. Deux types de milieux synthétiques ont été essayés: celui de Bergmann & Niemann (1936) tel que l'utilisent Wolff et ses collaborateurs (Wolff, Haffen, Kieny, & Wolff, 1953; Kieny, 1953), et un mélange des dix acides aminés essentiels de Rose dans les concentrations indiquées par White (1946). Dans les deux cas les solutions d'acides aminés étaient additionnées à volume égal d'une gélose (1 pour cent) dans le liquide de Gey. Les lavages et les dilutions sont faites au liquide de Tyrode ou au liquide de Pannett et Compton. Nous n'avons pas ajouté de pénicilline ni d'acide paraminobenzoïque au milieu de Bergmann et Niemann (B/10) comme l'ont fait Wolff et ses collaborateurs (Wolff, Haffen, Kieny, & Wolff, 1953b; Kieny, 1953).

L'un et l'autre de ces milieux ont dû être abandonnés car nous avons obtenu des croissances minimales, peu distinctes des allongements par imbibition (témoins composés de Tyrode seul), des gonflements anormaux du cartilage hypertrophié et de trop nombreux noyaux en pycnose.

Milieux naturels. Le caillot sur lequel sont déposées les ébauches est constitué d'un volume de plasma de coq, de préférence non hépariné et d'un volume d'extrait embryonnaire (3 gouttes). Ce dernier est préparé selon Fell & Robison (1929), c'est-à-dire au cours de chaque séance de repiquage à l'aide d'un embryon de 11 jours. Le liquide de Pannett et Compton est remplacé par le liquide de Tyrode, aussi bien pour la préparation de l'extrait embryonnaire que pour les lavages et les dilutions.

L'extrait embryonnaire est dilué de 20 à 200 fois selon les besoins de l'expérience.

Fixation et colorations des pièces

Les ébauches sont fixées au Zenker acétique après lavage dans le liquide de Tyrode. Les coupes sont faites longitudinalement à $6\ \mu$ d'épaisseur. La coloration d'Azan est utilisée pour l'examen histologique des pièces, particulièrement pour l'analyse du périoste. Seules les coupes passant par le centre de la diaphyse sont retenues. La coloration à l'hématoxyline picro-ponceau est utilisée pour le compte des mitoses. Toutes les coupes en série de l'ébauche entière sont alors soigneusement recueillies.

Mensuration des pièces osseuses

Les ébauches vivantes sont mesurées à l'aide d'un oculaire micrométrique placé dans la loupe montée. Ceci permet une mesure journalière de l'augmentation linéaire pendant la culture *in vitro* sans avoir à déplacer les objets, les conditions d'aseptie étant respectées. Les résultats sont exprimés en pour cent d'augmentation linéaire.

L'analyse du périoste est faite sur les coupes. L'épaisseur maximum d'os formé est mesurée sans tenir compte des assises de fibroblastes et d'ostéoblastes.

Cette mesure est faite en plaçant un oculaire micrométrique dans le microscope. Les résultats sont exprimés en μ .

Compte des mitoses

Les mitoses sont comptées dans l'ébauche entière, soigneusement coupée en série à 6 μ d'épaisseur. Toutes les coupes sont recueillies. Des contrôles arithmétiques ainsi que des mesures des dimensions des cellules nous ont autorisée à ne pratiquer les comptes de mitoses que dans une coupe sur trois. Un carton délimitant un carré précis est placé dans l'oculaire. Un compteur à mitoses nous permet d'enregistrer les quatre phases de la division cellulaire. Les résultats ont été notés séparément pour les épiphyses et pour la diaphyse (périoste).

Le nombre des cellules permettant d'établir les index mitotiques est évalué en comptant les champs (carré placé dans l'oculaire) de 3 types de cellules: cartilage à petites cellules, cartilage à grandes cellules, périoste (assises de fibroblastes et d'ostéoblastes). Des contrôles effectués au hasard ont toujours donné les mêmes valeurs approximatives pour ces trois types de cellules. Il n'a jamais été tenu compte du tissu conjonctif proliférant autour des ébauches en culture. Cette évaluation du nombre des cellules est pratiquée toutes les 6 coupes.

ACTION DE LA DICARNITINE SUR L'AUGMENTATION LINÉAIRE

Dans une première série d'expériences, des ébauches de tibias et de fémurs sont cultivées en présence de trois concentrations de dicarnitine (2.5, 0.25, et 0.025 mg./l.). Seule la première de ces concentrations permet d'observer une augmentation linéaire supérieure à celle des témoins (voir tableau 1), déjà après 7 jours de culture. Les deux concentrations inférieures donnent des courbes de croissance se confondant avec celles des témoins.

TABLEAU 1

Augmentation linéaire obtenue après 7 jours de culture en présence de trois dilutions d'extrait embryonnaire

<i>Dilution finale d'extrait embryonnaire</i>	<i>Tibias</i>		<i>Fémurs</i>	
	<i>Témoins %</i>	<i>2.5 mg./l. dicarnitine %</i>	<i>Témoins %</i>	<i>2.5 mg./l. dicarnitine %</i>
1/2	70	83	55	62
1/20	43	57	37	47
1/200	15	35	15	20

Sept concentrations de dicarnitine allant de 1.5 à 25 mg./l. sont ensuite essayées sur des tibias et des fémurs cultivés pendant 7 jours sur plasma (1/2) et extrait embryonnaire dilué (1/20, 1/100, et 1/200).

Les concentrations correspondant à 2.5 et 5 mg./l. de dicarnitine permettent une élévation supérieure à celle des témoins pour les ébauches cultivées sur

extrait embryonnaire 1/20 (écarts des pour cent d'augmentation linéaire par rapport à ceux des témoins: 3, 15, 15, 6, 28, et 28). Les concentrations supérieures et inférieures de dicarnitine donnent aussi des courbes de croissance se confondant avec celles des témoins.

Des résultats similaires sont obtenus pour les ébauches cultivées sur extrait embryonnaire 1/100. On remarque cependant que l'augmentation linéaire varie dans un rapport inversement proportionnel à la longueur initiale de l'ébauche et l'effet de la dicarnitine varie de la même façon. Plus l'ébauche est petite, plus elle s'accroît et plus elle est sensible au stimulus qu'apporte la dicarnitine.

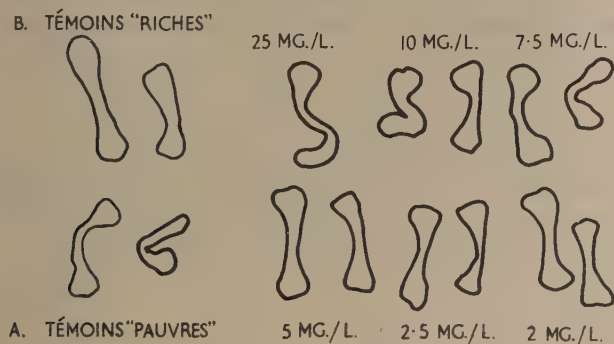


FIG. 1. Effet de 6 concentrations de dicarnitine sur la silhouette d'ébauches cultivées en milieu 'pauvre'.

A. Témoins cultivés sur milieu 'pauvre': plasma 1/2, extrait embryonnaire 1/200 (témoins réels des ébauches cultivées en présence de 5 mg./l. dicarnitine).

B. Témoins cultivés sur milieu 'riche': plasma 1/2, extrait embryonnaire 1/2.

Toutes les ébauches traitées par la dicarnitine sont cultivées sur le milieu A.

Les silhouettes des ébauches ont été décalquées sur des photographies prises avant la fixation.

Si on ne considère que l'augmentation linéaire supérieure à celle des témoins, les résultats des ébauches cultivées sur extrait embryonnaire 1/200 ne confirment plus ce qui vient d'être énoncé. En effet, aux concentrations élevées de 25, 10, 7.5 mg./l., les écarts de ces pourcentages avec ceux des témoins sont respectivement de 53, 18, et 28. Dans les essais précédents, l'aspect morphologique des ébauches en culture restait normal et toujours comparable à celui des témoins. Ces ébauches cultivées étaient conformes en outre aux descriptions données par Fell & Robison (1929). Sur cet extrait embryonnaire 1/200, les témoins sans dicarnitine sont très frêles, allongés et plus du tout comparables aux ébauches cultivées sur extrait embryonnaire 1/2 (voir figure 1 dans le texte). Il est à noter que la dicarnitine aux concentrations de 2.5 et 5 mg./l. change considérablement l'aspect morphologique des ébauches cultivées dans ces conditions. Si aucune augmentation linéaire supérieure à celle du témoin n'a pu être constatée (ce

dernier lui-même montrant un développement anormal sur ce milieu pauvre), l'aspect, la forme, l'épaisseur des ébauches cultivées en présence de 5 à 2.5 mg./l. de dicarnitine sont davantage comparables à l'aspect, la forme et l'épaisseur des témoins cultivés sur extrait embryonnaire non dilué (1/2) (voir figure 1 dans le texte). Les mêmes concentrations de dicarnitine qui, en milieu nutritif plus riche permettent de déceler une élongation supérieure à celle des témoins, rendent ici aux ébauches cultivées sur un milieu très appauvri presque l'aspect qu'elles auraient sur un milieu normal. Les coupes histologiques de ces ébauches confirment ces observations; leur analyse sera rapportée plus loin.

En résumé, les concentrations de dicarnitine racémique nécessaires pour obtenir une augmentation linéaire supérieure d'un tiers à deux tiers environ à celle des témoins correspondent à 2.5 et 5 mg./l.

ANALYSE DE L'EFFET DE LA DICARNITINE SUR L'OSSIFICATION PÉRIOSTIQUE

Un grand nombre d'ébauches (61) ont été mises en culture sur plasma (1/2, dilution finale) et extrait embryonnaire (1/200, dilution finale) en présence de 6 concentrations de dicarnitine racémique allant de 2 à 25 mg./l.

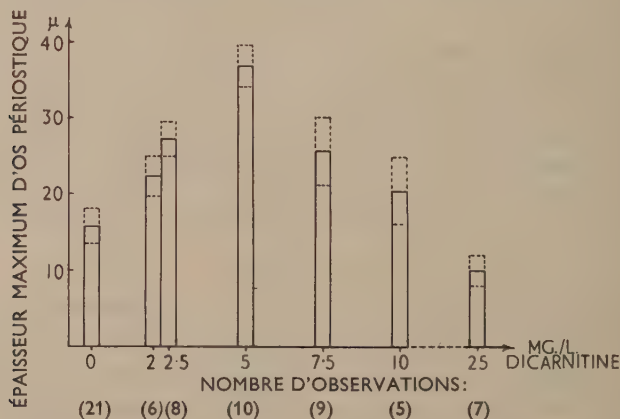


FIG. 2. Effet de 6 concentrations de dicarnitine sur l'épaisseur maximum d'os périostique formé après 7 jours de culture sur milieu carencé (plasma 1/2, extrait embryonnaire 1/200). En ordonnées: moyennes des mesures d'épaisseur maximum d'os \pm l'erreur standard de la moyenne.

Ces conditions de culture ont permis de démontrer que la dicarnitine semble suppléer, partiellement du moins, à la carence du milieu et rétablit l'aspect morphologique d'ébauches cultivées dans de meilleures conditions nutritives (voir figure 1 dans le texte). Après 7 jours de culture, les pièces sont fixées, coupées, colorées et examinées histologiquement. Rien de particulier n'est à remarquer au niveau des épiphyses constituées de cartilage à petites cellules. D'emblée

l'aspect du périoste attire l'attention. L'assise des fibroblastes et l'assise d'ostéoblastes sont plus importantes en présence de 2·5 et 5 mg./l. de dicarnitine. Sur-tout, une large couche d'os est déjà formée incluant parfois des ostéoclastes alors qu'elle est quasi inexistante dans les témoins. Les microphotographies de la planche 1 en donnent un exemple. Cette couche d'os est toutefois répartie sur toute la longueur de la diaphyse et non pas seulement en formant le 'sablier' que l'on rencontre dans l'os *in vivo*.

Des mesures de cette couche d'os, faites sans tenir compte des assises de fibroblastes et d'ostéoblastes, sont prises sur les coupes histologiques. Les tibias et les fémurs n'ont pas été distingués l'un de l'autre pour cette analyse. Ces mesures rassemblées permettent de faire une analyse statistique en appliquant le test 't' de Student. Les moyennes et leurs erreurs standard sont représentées à la figure 2 dans le texte. Cette analyse permet de conclure que l'effet de 2·5 et 5 mg./l. de dicarnitine est hautement significatif ($P < 0\cdot01$). L'effet de 7·5 mg./l. est encore significatif ($0\cdot02 < P < 0\cdot05$). La probabilité des plus hautes doses dépasse 0·2 et 0·3. La concentration de 5 mg./l. de dicarnitine semble être la plus active pour la stimulation de l'ossification périostique.

EFFET DE LA DICARNITINE SUR L'ACTIVITÉ MITOTIQUE

Fréquence et localisation des mitoses

Pour compléter et vérifier les résultats énoncés ci-dessus, une large étude de l'effet de la dicarnitine racémique sur le nombre des mitoses a été entreprise.

Toutes les ébauches de tibias et de fémurs de cette série d'expériences ont été cultivées sur plasma (1/2) et extrait embryonnaire (1/20). Cette dilution moyenne de l'extrait embryonnaire a été choisie car, sans appauvrir trop l'apport en éléments nutritifs, elle en limite les réserves et permet de déceler très régulièrement en présence de dicarnitine une augmentation linéaire supérieure à celle des témoins.

La concentration de dicarnitine offerte est de 2·5 mg./l. Celle de 5 mg./l. n'a pas été retenue de préférence à la précédente, malgré les résultats obtenus à l'analyse énoncée ci-dessus pour l'ossification périostique. Ceux-ci n'ont été connus que lorsque les cultures d'ébauches préparées en vue du compte des mitoses étaient déjà achevées et leurs coupes en train d'être pratiquées.

Les témoins sont toujours très soigneusement établis en cultivant les ébauches de l'autre patte du même embryon. Des contrôles, tant pour les différences possibles d'augmentation linéaire que pour le nombre des mitoses entre les ébauches droites et gauches, ont été satisfaisants. Deux à trois ébauches ont été cultivées puis comptées pour chaque jour de culture (1, 2, 3, 4, 5, et 7 jours). L'étude des fémurs est moins complète, mais permet de confirmer celle des tibias (voir figure 3 dans le texte).

Les courbes obtenues permettent de suivre le rythme de la croissance des ébauches *in vitro*. En effet, à première vue, on remarque la chute considérable

du nombre des mitoses dès le premier jour de culture. La dicarnitine atténue cette chute et permet de conserver un minimum de 600–700 mitoses au cours de la culture. Après 1 jour de culture, l'activité mitotique est maintenue à plus des 3/4 en présence de dicarnitine (1577 mitoses en moyenne) alors qu'elle est tombée à presque la moitié chez les témoins correspondants (1138 mitoses en moyenne).

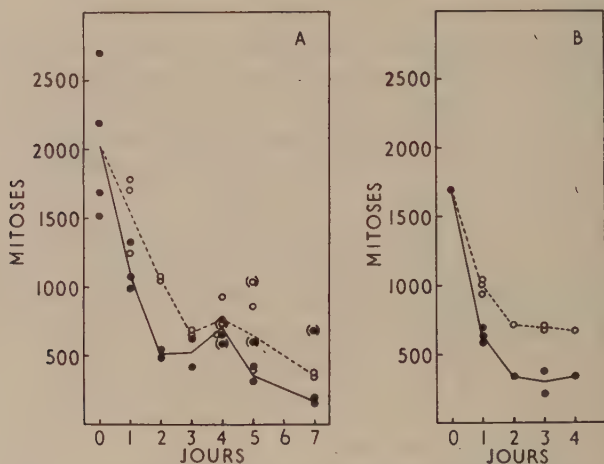


FIG. 3. Fréquence des mitoses après différentes durées de culture.

A. Tibias. B. Fémurs.

Points noirs et traits pleins: témoins: plasma 1/2, extrait embryonnaire 1/20.

Points clairs et pointillés: idem + 2.5 mg./l. dicarnitine.

Points entre parenthèses: ébauches cultivées en conditions spéciales: 4 jours de culture, pas de repiquage; 5 jours de culture, 2 repiquages aux 2^{ème} et 4^{ème} jours; 7 jours de culture, 2 repiquages tardifs aux 4^{ème} et 6^{ème} jours.

Les figures 4 et 5 dans le texte précisent la fréquence des mitoses au niveau des épiphyses et au niveau du périoste. Aucune mitose n'a été observée dans le cartilage hypertrophié du centre de la diaphyse, sauf *in vivo* où elles représentent un très faible pourcentage de l'ensemble.

Si l'effet de la dicarnitine se marque encore sur le nombre des mitoses au niveau des épiphyses, cet effet est beaucoup plus net au niveau du périoste. Chez les témoins, la chute du nombre des cellules en division est rapide et considérable: après un jour, il ne reste qu'1/3 en moyenne des mitoses et après trois jours, 6 pour cent seulement du nombre des mitoses initiales se retrouvent dans le périoste. La dicarnitine permet de maintenir une moyenne de 45 pour cent du nombre des mitoses initiales pendant les 4 premiers jours de la culture.

Les repiquages dont l'effet est visible au 4^{ème} jour améliorent sensiblement la situation chez les témoins. Sans vouloir avancer qu'ils ne sont pas du tout aussi nécessaires en présence de dicarnitine, leur effet influence moins la fréquence

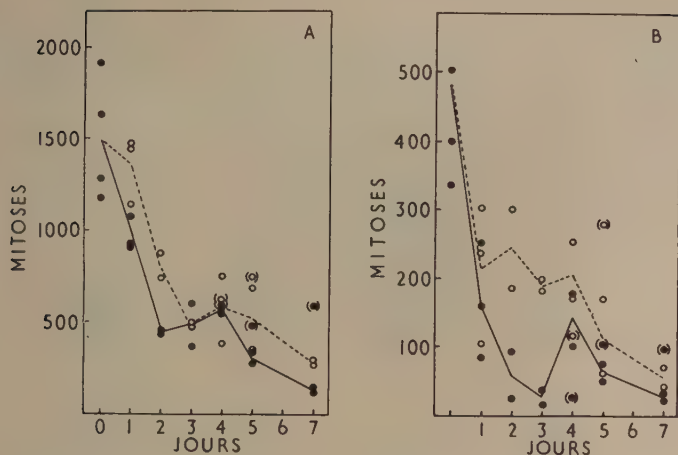


FIG. 4. Fréquence des mitoses dans les épiphyses et dans le périoste des tibias après différentes durées de culture.

A. Épiphyse. B. Périoste.

Points noirs et traits pleins: témoins: plasma 1/2, extrait embryonnaire 1/20.

Points clairs et pointillés: idem + 2.5 mg./l. dicarnitine.

Points entre parenthèses: voir légende de la figure 3.

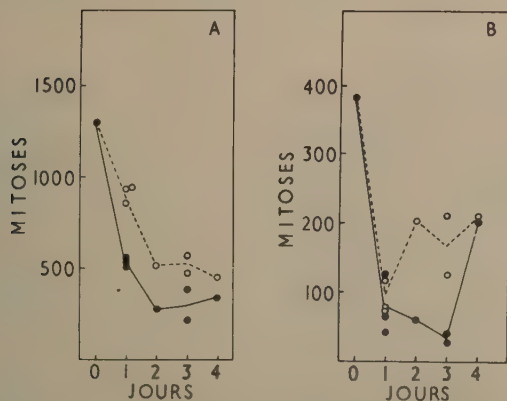


FIG. 5. Fréquence des mitoses des épiphyses et du périoste des fémurs après différentes durées de culture.

A. Épiphyse. B. Périoste.

Points noirs et traits pleins: témoins: plasma 1/2, extrait embryonnaire 1/20.

Points clairs et pointillés: idem + 2.5 mg./l. dicarnitine.

des mitoses, celle-ci étant moins ralentie en présence de dicarnitine. Les points indiqués entre parenthèses sur les courbes illustrent bien l'effet stimulant des repiquages. Au 4^{ème} jour, l'absence de repiquage fait tomber la fréquence des mitoses au niveau du périoste (figure 4 dans le texte) aussi bien en absence qu'en présence de dicarnitine. Dans les épiphyses et dans l'ébauche entière, l'absence de repiquage n'a pas marqué de changement sur la fréquence des mitoses. Les points entre parenthèses du 5^{ème} jour, pour lesquels deux repiquages avaient été pratiqués, indiquent une reprise de l'activité mitotique dans l'ébauche entière.

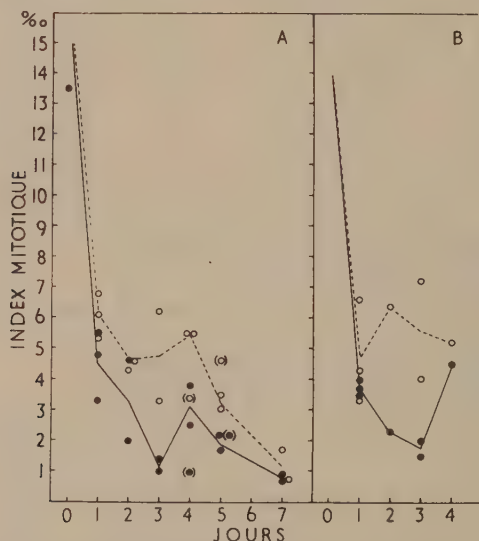


FIG. 6. Index mitotique des périostes de tibias et de fémurs après différentes durées de culture.

A. Tibias. B. Fémurs.

Points noirs et traits pleins: témoins: plasma 1/2, extrait embryonnaire 1/20.

Points clairs et pointillés: idem + 2.5 mg./l. dicarnitine.

Points entre parenthèses: voir légende de la figure 3.

Enfin, une culture de 7 jours ayant subi deux repiquages plus tardifs que d'habitude est plus riche en mitoses que les autres cultures du même âge.

La figure 6 dans le texte indique l'index mitotique obtenu pour le périoste. Cette façon d'exprimer les résultats n'a pas été retenue systématiquement car elle introduit un facteur d'erreur supplémentaire, celui de l'évaluation du nombre des cellules. De plus, le nombre total des cellules est l'image retardée de la fréquence des mitoses et ceci peut dans certains cas fausser l'interprétation.

En résumé, la dicarnitine augmente l'activité mitotique *in vitro*; l'effet en est surtout marqué au niveau du périoste où elle permet de maintenir un rythme de la division cellulaire représentant 45 pour cent de ce qu'il était *in vivo*.

Répartition des phases de la division cellulaire

Au cours de l'étude décrite ci-dessus, les quatre phases de la mitose ont été soigneusement distinguées et notées. Outre les images de plaque équatoriale, les

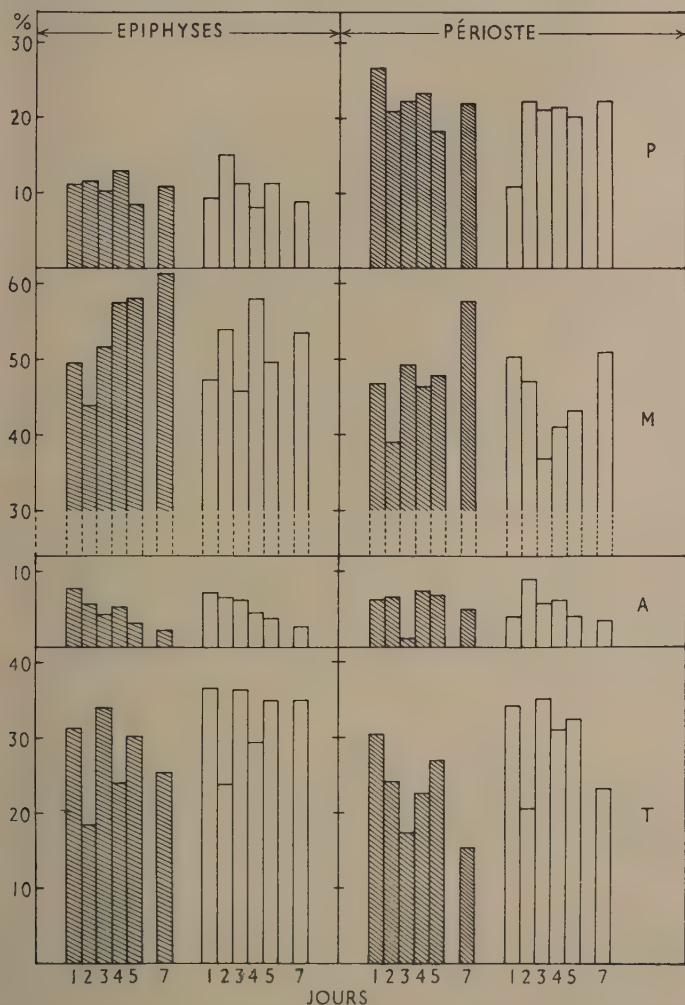


FIG. 7. Répartition des pourcentages moyens des quatre phases de la mitose dans les épiphyses et le périoste après différentes durées de culture.

P = prophases, M = métaphases, A = anaphases, T = télophases.

Hachures: témoins: plasma 1/2, extrait embryonnaire 1/20.

Blancs: idem + 2.5 mg./l. dicarnitine.

Les numérations n'ont pas été faites au 6^{ème} jour.

groupements de chromosomes en l'absence de nucléoles (prométaphases) ont été comptés comme des métaphases. Les images où les noyaux sont reconstitués

mais où les cytoplasmes ne sont pas encore séparés complètement en deux cellules distinctes sont comptées comme des télophases. Nous avons rassemblé ces résultats, en avons calculé les pourcentages moyens afin de savoir si la dicarnitine intervenait ou non dans la répartition normale des phases mitotiques. D'autre part, cette analyse permet également de contrôler chez les témoins si cette répartition se maintient au cours de la culture et si elle est comparable dans les épiphyse et au niveau du périoste.

Les résultats des pourcentages moyens sont représentés à la figure 7 dans le texte. Comme ces pourcentages sont établis sur des nombres très différents les uns des autres (nombre total des mitoses comptées par épiphyse ou diaphyse d'une ébauche) une représentation graphique a permis de contrôler si ce facteur peut modifier considérablement la variation du pourcentage moyen ainsi calculé, ce qui ne semble pas le cas. Les pourcentages indiqués à la figure 7 dans le texte sont donc calculés pour chaque jour de culture, sur les totaux de chaque phase additionnés et rapportés au nombre total des mitoses comptées.

D'emblée, il ne semble pas que la dicarnitine ait une influence sur la répartition des phases, si ce n'est que les métaphases sont moins abondantes et qu'au contraire, les télophases sont mieux représentées. La dicarnitine aurait tendance à donner une image plus normale de l'ensemble (voir discussion):

L'examen des pourcentages des prophases apporte une indication étonnante. Le nombre des prophases est presque le double dans le périoste de ce qu'il est dans les épiphyses. Ceci est marqué aussi bien en présence qu'en absence de dicarnitine. Cette différence est compensée par une petite diminution des métaphases et une très légère diminution des télophases dans le périoste.

Il faut noter l'augmentation du pourcentage des métaphases, surtout marquée dans les épiphyses des témoins. Plus la culture est âgée, plus il y a de métaphases enregistrées. L'inverse se retrouve pour les anaphases et les télophases qui deviennent plus rares en fonction de l'âge des cultures. Là encore, pas d'interférence due à la dicarnitine si ce n'est que cette observation est moins frappante. Il ne faut pas oublier en interprétant ces résultats que l'augmentation du pourcentage d'une phase de la mitose correspond à l'allongement de la durée de cette phase.

En résumé, si les observations d'anomalies dans la répartition des phases de la mitose sont attribuables au 'handicap' de la mise en culture des ébauches et de la durée de celle-ci, la dicarnitine n'intervient pas, si ce n'est pour atténuer ces anomalies. La confrontation de ces données avec celles d'autres auteurs trouvera sa place dans la discussion qui suit.

DISCUSSION

Nous regrettons que des milieux synthétiques n'aient pu être utilisés pour l'étude décrite ci-dessus. Ils auraient permis de contrôler l'apport en éléments nutritifs et éventuellement de remplacer l'un d'entre eux par la dicarnitine racémique, en particulier les donneurs de méthyle. L'hypothèse déjà émise par

le groupe de Fraenkel (Carter, Bhattacharyya, Weidman, & Fraenkel, 1952b) que la carnitine participerait à la transméthylation *in vivo* aurait pu ainsi être vérifiée *in vitro*. Verly & Bacq (1954) ont cependant démontré par une vaste expérience de nutrition que la dicarnitine racémique est un mauvais donneur de méthyle pour le jeune rat blanc, comparativement à la choline.

La recherche a été orientée non plus sur la compréhension de l'incorporation

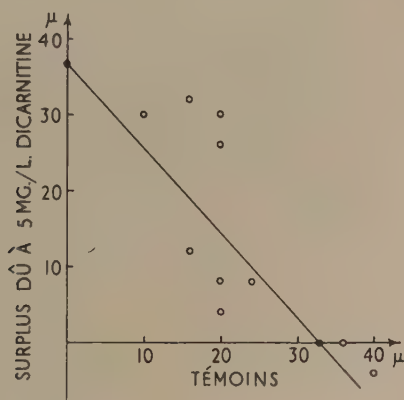


FIG. 8. Droite de régression de l'effet de la dicarnitine sur l'épaisseur d'os périostique formé.

Abscisses: épaisseur maximum d'os périostique des témoins.

Ordonnées: surplus d'épaisseur maximum d'os périostique dû à la présence de 5 mg./l. de dicarnitine.

Les points clairs représentent les valeurs expérimentales. Les points noirs sont les points d'intersection avec les axes de la droite la plus probable, calculée par la règle des moindres carrés (pour détails, voir Snedecor, 1946).

et du métabolisme de la dicarnitine mais sur l'observation de ses effets sur la croissance et la différenciation des ébauches en culture. Soulignons que l'action de la dicarnitine est ainsi démontrée pour la première fois chez les Vertébrés. Outre la mise en évidence de l'action très régulière de la dicarnitine favorisant l'augmentation linéaire, l'ossification périostique et l'activité mitotique, cette recherche a apporté une contribution à la compréhension générale du mode de croissance des tibias et des fémurs en culture, en particulier du rôle important qu'y joue le périoste.

Des observations et des analogies de détails seront d'abord exprimées dans cette discussion et des relations plus générales seront rapportées ensuite.

Malgré les précautions de mise en incubation comparables, il n'a pas été possible d'obtenir régulièrement des embryons de taille égale. Des facteurs incontrôlables interviennent: saison, mue des poules, vitalité des œufs. Il semble exister un rapport inverse entre la longueur initiale de l'ébauche mise en culture

et ses possibilités d'accroissement. Plus l'ébauche est petite et peu différenciée, plus elle est susceptible de s'allonger et d'être sensible à l'action stimulante de la dicarnitine.

On remarque de même que l'effet de la dicarnitine sur l'ossification périostique est d'autant moins marqué que cette ossification est amorcée, comme le montre la figure 8 dans le texte. La corrélation qui lie l'effet stimulant de la dicarnitine à l'épaisseur maximum d'os des témoins peut s'exprimer par une droite de régression (droite la plus probable) calculée par la règle des moindres carrés. Le coefficient de corrélation (coefficient angulaire de la droite) est négatif ($r = -0.754$); l'écart de la droite par rapport à l'horizontale est statistiquement significatif ($t = 3.295$; $0.01 < P < 0.02$). Autant qu'on puisse en juger, il ne se fait guère d'ossification périostique chez les témoins dans ce milieu très dilué. Les ébauches qui ici témoignent d'une ossification déjà avancée en l'absence de dicarnitine proviennent probablement d'embryons chez lesquels cette ossification a eu lieu *in vivo*. Aussi, la corrélation négative peut-elle s'expliquer de deux manières: (a) les conditions ont été favorables à une ossification *in vitro* chez les témoins, (b) les ébauches avaient déjà amorcé cette ossification *in vivo* avant leur prélèvement. Quelle que soit la cause de l'état des témoins, l'effet de la dicarnitine se marque comparativement moins quand ceux-ci ont une belle ossification périostique. Il aurait peut-être été avantageux de cultiver des ébauches d'embryons incubés 5 ou 6 jours au lieu de 7, tant pour l'étude de l'allongement que pour celle de la différenciation.

Rappelons que les comptes de mitoses ont toujours été pratiqués sur des ébauches cultivées sur plasma et extrait embryonnaire, ce dernier dilué 1/20. L'image du rythme de croissance qu'offre cette estimation de l'activité mitotique est celle d'ébauches déjà en état d'infériorité non seulement par la mise en culture, mais encore par un apport en substances nutritives relativement pauvre. Jacoby, Trowell, & Willmer (1937) démontrent que l'enrichissement en extrait embryonnaire réduit la période intercinétique. De plus, la durée des mitoses est plus longue quand la concentration en extrait embryonnaire est basse. Ce dernier point pourrait expliquer l'accumulation des métaphases observées en fonction de l'âge des cultures. Il aurait été intéressant de savoir où se situerait la moyenne des mitoses d'une ébauche cultivée sur extrait embryonnaire entier ou mieux encore d'une ébauche cultivée sur un milieu enrichi en glucose et glycérophosphates tel que celui utilisé par Fell & Mellanby (1952) pour leur étude sur l'hypervitaminose A. Cependant, notre milieu relativement carencé a permis de mieux déceler les points vulnérables des ébauches cultivées et surtout met mieux en évidence l'action favorisante d'un facteur de croissance, tel que la dicarnitine étudiée ici.

La répartition des phases de la division cellulaire reflète également le mode de croissance *in vitro*. Les pourcentages de ces phases varient avec la durée de la culture: les métaphases augmentent avec l'âge des cultures alors que les anaphases et les télophases diminuent.

Le tableau 2 dans le texte confronte les pourcentages moyens obtenus avec ceux de Chèvremont (1956), Bucher (1948), et Jacobson (1954) pour des cultures de tissus; ce dernier auteur donne probablement une autre définition de l'anaphase que Chèvremont et Bucher. En additionnant les pourcentages obtenus, à l'anaphase et à la télophase, on arrive à un chiffre de même ordre de grandeur pour les trois auteurs; il faut toutefois rappeler que nos numérations sont faites

TABLEAU 2

Répartition des phases de la mitose dans des cellules et des ébauches osseuses cultivées in vitro

	<i>Prophases</i> %	<i>Métaphases</i> %	<i>Anaphases</i> %	<i>Télophases</i> %	<i>Total des mitoses comptées</i>
Fibroblastes et myoblastes d'embryon de poulet (cultures vivantes) Chèvremont, 1956 . . .	11	39	6	44	—
Fibroblastes de lapin (cultures fixées) (Bucher, 1948) . . .	18.5	34.5	5.6	41.4	6 000
Ostéoblastes d'embryon de poulet (cultures fixées) (Jacobson, 1954)	15-18	36-38	21-23	23-27	—
Ébauchés de tibias (coupes de cultures):					
Épiphyes témoins . . .	11.0	54.0	4.7	25.6	7 313
„ dicarnitine . . .	10.9	51.5	5.2	32.4	10 216
Périostes témoins . . .	19.0	47.8	5.6	22.8	815
„ dicarnitine . . .	19.9	44.9	5.6	29.3	1 758

sur des coupes histologiques, un certain nombre de télophases peuvent éventuellement être ainsi réparties sur 2 coupes et être interprétées soit comme métaphases, soit comme noyaux intercinétiques. Ceci pourrait dans une certaine mesure expliquer nos chiffres élevés de métaphases et bas de télophases. Il est cependant peu vraisemblable que cette erreur d'interprétation due au matériel débité en coupes puisse entraîner une différence de plus de 10 pour cent. Les conditions de culture (extrait embryonnaire 1/20) relativement pauvres ont pu ralentir la durée des mitoses comme le signalent Jacoby, Trowell, & Willmer (1937) et provoquer ainsi une accumulation anormale de métaphases. Il est possible que ces apports varient dans les différents tissus ainsi que paraît l'indiquer l'écart des pourcentages de prophases dans le périoste et les épiphyses des mêmes ébauches.

L'étude ci-dessus apporte un argument expérimental de plus à la deuxième hypothèse qu'exprime Lacroix (1949) dans sa monographie: 'le périoste répartit son étirement sur toute sa longueur'. La fréquence des mitoses est en effet très également répartie sur tout le périoste. De plus, en milieu dilué, l'effet de la dicarnitine se marque par une ossification à ce niveau très marquée et régulière sur

toute la longueur. La concordance des résultats obtenus par les deux méthodes d'investigation est remarquable. L'effet de la dicarnitine qui d'abord se marque par une recrudescence de l'activité ostéogénique du périoste dans les ébauches cultivées sur extrait embryonnaire très dilué, permet aussi de maintenir pendant quelques jours une activité mitotique dans le périoste correspondant à 45 pour cent de ce qu'elle est *in vivo*. La carence en éléments nutritifs provoque, en l'absence de dicarnitine, une chute considérable de l'activité mitotique générale, mais surtout marquée dans le périoste où il ne reste après trois jours de culture que 6-7 pour cent de l'activité *in vivo*. Une reprise des divisions cellulaires a lieu dès qu'un repiquage renouvelle l'apport en éléments nutritifs. Cette reprise est surtout marquée également au niveau du périoste. Si l'on procédait à des repiquages quotidiens, l'on améliorerait vraisemblablement la croissance et la différenciation des ébauches en culture.

Comment faut-il interpréter les pourcentages de prophases plus élevés dans le périoste que dans les épiphyses? Ce chiffre ne semble pas être influencé par le nombre total des mitoses comptées qui, lui, reflète l'activité mitotique réelle, pas plus que par l'action de la dicarnitine. Il n'est pas vraisemblable qu'une erreur d'interprétation puisse interférer ici car les numérations dans les épiphyses et dans le périoste ont été faites très parallèlement, sans distinction aucune et sur le même matériel.

Il semble donc que l'état du périoste soit un bon critère d'examen d'une ébauche cultivée *in vitro*. Il est certain que la situation périphérique de celui-ci explique en partie ces observations. Les mitoses, sans que leur localisation ait

TABLEAU 3

Augmentation du nombre total des cellules après 7 jours de culture

	<i>Témoins</i> %	<i>Dicarnitine</i> %
Ébauche entière	55	62
Épiphyses	55	50
Périoste	46	80
Cartilage hypertrophié . .	92	130

été précisée, paraissent dans l'ensemble plus fréquentes en bordure des épiphyses qu'au centre. Il n'est pas surprenant que l'activité mitotique du périoste soit plus élevée dans des ébauches chez lesquelles on a observé une augmentation linéaire supérieure. L'apport d'un facteur stimulant tel que la dicarnitine se fait au niveau des fibroblastes et l'allongement du périoste doit précéder celui de l'ébauche entière ou lui être simultané. Les approximations des nombres totaux des cellules dans les différentes ébauches étudiées en absence et en présence de dicarnitine (voir tableau 3) permettent d'observer que la moyenne d'accroissement en cellules du cartilage hypertrophié est presque doublée par rapport à

celle des autres tissus de l'ébauche après 7 jours de culture. La dicarnitine change ces valeurs seulement dans la diaphyse où elles passent de 46 à 80 pour cent dans le périoste et de 92 à 130 pour cent dans le cartilage hypertrophié. Notons que ce tissu n'est le siège d'aucune activité mitotique. Ceci serait en accord avec l'idée que l'allongement se fait par l'étirement du périoste sur toute sa longueur entraînant une formation de cartilage hypertrophié aux dépens du cartilage à petites cellules des épiphyses. Il est arrivé à plusieurs reprises qu'une ébauche cultivée sur dicarnitine ayant marqué une augmentation linéaire supérieure à celle du témoin, totalise un moins grand nombre de cellules ou un nombre similaire à celui du témoin. Dans ces cas, le nombre des cellules du cartilage hypertrophié est plus grand que chez les témoins, alors que celui des petites cellules du cartilage est moins important; le périoste lui-même totalise un plus grand nombre de cellules. Pour cette raison encore, il n'aurait pas été correct d'exprimer tous les résultats en index mitotiques.

Ces observations semblent indiquer que dans le cas présent, les phénomènes de croissance ne sont point séparés des phénomènes de différenciation mais, au contraire, liés et dépendants l'un de l'autre.

RÉSUMÉ

1. Nous avons cultivé des ébauches de tibias et de fémurs d'embryons de poulet âgés de 7 jours en l'absence et en présence de dicarnitine racémique. Le caillot était formé de plasma de coq et d'extrait embryonnaire, ce dernier parfois dilué de 20 à 200 fois.

2. En présence de 2.5 et 5 mg./l. de dicarnitine, l'augmentation linéaire des ébauches osseuses est supérieure d'un tiers à deux tiers à celle des témoins lorsque l'extrait embryonnaire est non dilué ou dilué de 20 à 100 fois. Avec de l'extrait embryonnaire dilué à 1/200, aucune augmentation linéaire supérieure à celle des témoins n'est constatée, mais l'aspect morphologique des ébauches est presque comparable à celui d'ébauches cultivées sur extrait embryonnaire non dilué.

3. L'examen histologique des ébauches cultivées en présence de dicarnitine sur extrait embryonnaire dilué à 1/200 révèle une ossification périostique plus avancée que dans les témoins. Les mesures de l'épaisseur maximum d'os périostique formé et leur analyse statistique prouvent que l'effet de 2.5 et 5 mg./l. de dicarnitine est hautement significatif. Sur extrait embryonnaire moins dilué, cette différence n'est pas décelable.

4. Le compte des mitoses pratiqué sur des ébauches cultivées de 1 à 7 jours sur extrait embryonnaire dilué à 1/20 révèle une action régulière et favorisante de la dicarnitine (2.5 mg./l.) sur l'activité mitotique, surtout dans le périoste. A ce niveau, la dicarnitine maintient pendant 4 jours une activité mitotique de 45 pour cent de ce qu'elle était *in vivo*, alors que celle-ci est tombée à 6 pour cent en 3 jours de culture chez les témoins. L'utilité de repiquages fréquents est démontrée.

5. Le pourcentage des prophases est plus élevé dans le périoste que dans les épiphyses. La fréquence des métaphases augmente, celle des anaphases et des télophases au contraire diminue en fonction de l'âge des cultures. La répartition des phases de la mitose semble peu influencée par la dicarnitine.

6. Après 7 jours de culture (extrait embryonnaire 1/20), le nombre des cellules est davantage augmenté dans le cartilage hypertrophié de la diaphyse que dans les autres tissus. La dicarnitine modifie peu le nombre total des cellules de l'ébauche entière, mais double presque le nombre des cellules du périoste et renforce encore l'augmentation du nombre des cellules du cartilage hypertrophié.

SUMMARY

1. Tibias and femurs of 7-day-old chick embryos were cultivated in the absence and in the presence of racemic dicarnitine on a solid medium (fowl plasma + embryo extract, the latter usually diluted 20- to 200-fold).

2. The growth in length of the bones was increased by 1/3 to 2/3 in comparison with the controls, when 2.5 and 5 mg./l. of dicarnitine was added and when the embryo extract was not diluted more than 100-fold. With embryo extract diluted 200-fold, the shape of the bone was abnormal. Dicarnitine in this case restored the normal shape without increasing the elongation.

3. Dicarnitine in a medium containing embryo extract diluted 200-fold was found to increase the maximal thickness of the periosteal bone in comparison with the controls. This effect was statistically highly significant in the case of dicarnitine concentrations of 2.5 and 5 mg./l. The effect was not found with non-diluted embryo extract.

4. Mitoses were counted in tibias and femurs cultivated *in vitro* for periods of 1 to 7 days. 2.5 mg./l. dicarnitine was shown to promote mitotic activity. In the periosteum, it maintained for 4 days a mitotic activity equal to 45 per cent. of the mitotic activity *in vivo*. *In vitro* controls retained only 6 per cent. of this activity. The usefulness of frequent transfers was demonstrated.

5. The percentage of prophases was higher in the periosteum than in the epiphyses. The relative frequency of metaphases increased with the age of the cultures. The frequency distribution of the phases of mitosis was shown to be very little changed by dicarnitine.

6. After 7 days of culture, the number of cells was more increased in the hypertrophic cartilage than in other tissues. Dicarnitine did not much increase the total number of cells; there was practically no effect on the number of cells of the epiphyses but a large increase in the number of cells of the periosteum and of the hypertrophic cartilage was observed.

REMERCIEMENTS

L'auteur exprime sa gratitude au Professeur et à Madame Maurice Chèvremont pour leurs conseils avisés et l'intérêt qu'ils n'ont cessé de marquer au cours de

cette recherche. Elle remercie vivement M. Jean Lorquet qui a préparé les coupes histologiques. Elle est reconnaissante aux Laboratoires Labaz d'avoir aimablement mis la dicarnitine à sa disposition.

TRAVAUX CITÉS

- BERGMANN, M., & NIEMANN, C. (1936). On blood fibrin. A contribution to the problem of protein structure. *J. biol. Chem.* **115**, 77-85.
- BUCHER, O. (1948). *Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen mit Berücksichtigung der Histiophysiologie und der mikroskopischen Diagnostik*. Bern: Hans Huber.
- CARTER, H. E., BHATTACHARYA, P. K., WEIDMAN, KATHARINE R., & FRAENKEL, G. (1952a). The identity of vit. B₇ with carnitine. *Arch. Biochem. Biophys.* **35**, 241-2.
- (1952b). Chemical studies on vitamin B_T. Isolation and characterization as carnitine. *Arch. Biochem. Biophys.* **38**, 405-16.
- CHÈVREMONT, M. (1956). *Notions de cytologie et histologie*. Liège: Desoer.
- DECHAMPS, G., BUU-HOI, N. P., LE BIHAN, H., & BINON, F. (1954). Préparation d'un dérivé stable de la carnitine. *C.R. Acad. Sci., Paris*, **238**, 826-8.
- FELL, H. B., & MELLANBY, E. (1952). The effect of hypervitaminosis A on embryonic limb-bones cultivated *in vitro*. *J. Physiol.* **116**, 320-49.
- & ROBISON, R. (1929). The growth, development and phosphatase activity of embryonic avian femora and limb-buds cultivated *in vitro*. *Biochem. J.* **23**, 767-84.
- FRAENKEL, G. (1951). Effect and distribution of vitamin B_T. *Arch. Biochem. Biophys.* **34**, 457-67.
- (1953). Studies on the distribution of vitamin B_T (carnitine). *Biol. Bull. Wood's Hole*, **104**, 359-71.
- (1954). The distribution of vitamin B_T (carnitine) throughout the animal kingdom. *Arch. Biochem. Biophys.* **50**, 486-95.
- & BLEWETT, M. (1947). The importance of folic acid and unidentified members of the vitamin B complex in the nutrition of certain insects. *Biochem. J.* **41**, 469-75.
- & COLES, M. (1948). B_T a new vitamin of the B-group and its relation to the folic acid group, and other anti-anaemia factors. *Nature, Lond.* **161**, 981-3.
- GOETSCH, W. (1946). Vitamin 'T', ein neuartiger Wirkstoff. *Österr. zool. Z.* **1**, 49-56.
- GULEWITSCH, W., & KRIMBERG, R. (1905). Zur Kenntnis der Extraktivstoffe der Muskeln. II. Mitteilung. Über das Carnitin. *Hoppe-Seyl. Z.* **45**, 326-30.
- JACOBSON, W. (1954). The mode of action of folic acid antagonists on cells. *J. Physiol.* **123**, 603-17.
- JACOB, F., TROWELL, O. A., & WILLMER, E. N. (1937). Studies on the growth of tissues *in vitro*. Further observations on the manner in which cell division of chick fibroblasts is affected by embryo tissue juice. *J. exp. Biol.* **14**, 255-66.
- KIENY, MADELEINE (1953). Action de l'acide para-aminobenzoïque sur la croissance du tibia cartilagineux d'embryon de Poulet en culture *in vitro*. *C.R. Acad. Sci., Paris*, **236**, 1920-2.
- KNOTH, W. (1952). Untersuchungen über den 'Vitamin T-Komplex Goetsch' mit Hilfe der Gewebezüchtung. *Arch. exp. Path. Pharmac.* **214**, 501-6.
- LACROIX, P. (1949). *L'Organisation des os*. Liège: Desoer.
- LECLERCQ, J. (1950). La vitamine T, facteur de croissance pour les larves de *Tenebrio molitor*. *Arch. int. Physiol.* **57**, 350-2.
- (1954). Action vitaminique de la 'DL-dicarnitine' chez *Tenebrio molitor* L. (insecte, coléoptère). *Arch. int. Physiol.* **62**, 101-8.
- SNEDECOR, G. W. (1946). *Statistical methods applied to experiments in agriculture and biology*. Fourth edition. Ames, Iowa: The Iowa State College Press.
- VERLY, W. G., & BACQ, Z. M. (1954). Prise oralement, la 'dicarnitine' racémique n'est pas un bon donneur de méthyle pour le rat. *Biochim. biophys. Acta*, **13**, 454-5.
- WHITE, P. R. (1946). Cultivation of animal tissues *in vitro* in nutrients of precisely known constitution. *Growth*, **10**, 231-89.

- WOLFF, E., HAFFEN, KATY, KIENY, MADELEINE, & WOLFF, ÉMILIENNE (1953a). Sur la culture d'organes embryonnaires en milieu synthétique. *C.R. Acad. Sci., Paris*, **236**, 137-9.
- (1953b). Essais de culture *in vitro* d'organes embryonnaires en milieux synthétiques. *J. Embryol. exp. Morph.* **1**, 55-84.

EXPLICATION DE LA PLANCHE

FIG. A. Périoste de l'ébauche de tibia témoin, cultivée sur plasma 1/2 et extrait embryonnaire 1/200.

FIG. B. Périoste de l'ébauche de tibia cultivée sur plasma 1/2 et extrait embryonnaire 1/200 + 5 mg./l. dicarnitine.

Les coupes longitudinales sont colorées par la méthode d'Azan. Grossissement: $382.5\times$.

(*Manuscript received 22:xi:55*)



FIG. 1

FIG. 2

S. LIÉBECQ-HUTTER

Régénération du tissu musculaire strié dans des pertes de substance expérimentales de l'œsophage chez le chien

par D. PICARD, E. HENRY, G. COTTE, et J. A. INGLESAKIS¹

Laboratoires d'Histologie (Pr. Picard) et de Chirurgie Expérimentale (Pr. De Vernejoul) de la
Faculté de Médecine de Marseille

AVEC UNE PLANCHE

INTRODUCTION

UNE lésion destructive du tissu musculaire strié est souvent suivie d'une cicatrisation fibreuse; longtemps, la majorité des auteurs a pensé que seule cette éventualité était possible; d'après la revue générale de von Meyenburg (1929), elle reste la plus fréquente, surtout après les grosses pertes de substance. Toutefois la possibilité d'une régénération, soutenue d'abord par des auteurs isolés, n'est plus aujourd'hui mise en doute; seules diffèrent les opinions sur les modalités de cette régénération et le rythme de son déroulement; notre propos est de verser à ce débat les constatations faites dans le cas, à vrai dire très particulier, de la régénération de la musculature striée œsophagienne du Chien, après des pertes de substance expérimentales obturées par une intervention plastique.

HISTORIQUE

Waldeyer (1865) a décrit la régénération consécutive à la dégénérescence cireuse de Zenker: dans le 'tube musculaire' formé par le sarcolemme intact, le protoplasme dégénéré est phagocyté par des éléments migrants, venus du conjonctif voisin; ultérieurement, ces éléments immigrés prolifèrent, fusionnent, donnant naissance à un ruban ou à une 'bande cellulaire' qui est l'ébauche d'une nouvelle fibre; des myofibrilles d'abord homogènes, puis striées, y apparaissent ensuite. Telle est la théorie de Waldeyer: *régénération dite discontinue*, ou de type embryonnaire; elle reproduit dans le tube sarcolemmal un processus analogue à l'histogénèse normale du tissu musculaire strié, à cette différence près que les éléments cellulaires néoformés proviennent de cellules mésenchymateuses migratrices; mais ils n'ont aucune continuité directe avec les fibres restées saines.

Weber (1867) interprète différemment les images décrites par Waldeyer; pour

¹ Authors' address: Laboratoires d'Histologie et de Chirurgie Expérimentale, Faculté de Médecine, Université d'Aix-Marseille, Marseille, France.

lui, les cellules qui occupent la cavité du tube sarcolemmal ne sont pas venues du conjonctif, mais sont des 'sarcolytes' ou fragments nucléés de protoplasme musculaire ayant échappé au processus dégénératif; doués alors de propriétés macrophagiques, ces éléments assurent l'élimination des produits de la dégénérescence. Puis ceux qui se trouvent aux extrémités du tube jouent le rôle de 'sarcoblastes', fusionnent, et le résultat final est encore la bande cellulaire de Waldeyer, où va se faire le fibrillogénèse. Le rapprochement s'impose, aujourd'hui, entre cette description et les faits de transformation histiocytaire des fibres musculaires striées que nous ont fait connaître la pathologie et la culture *in vitro* (Chèvremont, 1942, 1945; suivant les travaux de J. A. Thomas, 1943); mais cette confrontation critique nous écarterait de l'objet limité du présent travail.

La théorie des 'sarcolytes' fut développée ensuite par Weber lui-même, par Gussenbauer (1871), Kraske (1878), Volkmann (1893), Pielsticker (1909), Stemmler (1914).

Volkmann établit une différence entre les processus de régénération qui suivent une section simple et une dégénérescence cireuse; après section, Volkmann, puis Schmincke (1907-8-9), Thoma (1906-9-10) décrivent la régénération par 'bourgeonnement': dans les fibres restées intactes, au bord de la lésion, les noyaux se multiplient par amitose, l'ensemble de la fibre se renfle en massue avec une file axiale de noyaux; ces masses syncytiales afibrillaires, véritables bourgeons plasmodiaux émis par les fibres saines sectionnées, s'accroissent de façon à rejoindre des bourgeons semblables émanés des fibres de l'autre lèvre de la plaie. Les myofibrilles, d'abord lisses, groupées en fascicules, puis striées, se forment de proche en proche en arrière du bourgeon indifférencié.

Ainsi la *théorie de la régénération continue* de Weber et de Volkmann s'oppose à la régénération discontinue de Waldeyer. Volkmann admet du reste l'existence des deux processus; pour lui, c'est bien le processus discontinu décrit par Waldeyer, qui se déroule après une lésion dégénérative, type Zenker; Thoma (1906) ajoute que le bourgeonnement peut y contribuer, et adopte donc une position très éclectique.

Après les travaux de Godlewski (1902), de Heidenhain (1913), de Langley (1917), de Martin (1919), des recherches effectuées sur les Amphibiens (de Giorgi & Guyénot, 1923; Guyénot, 1930; Naville, 1922) apportent de nouvelles précisions; Naville (1922) établit que la régénération ne peut procéder que de la partie non différenciée, interfibrillaire du sarcoplasme.

Forbus (1926) est amené à appuyer de nouveau expérimentalement la théorie de Waldeyer.

Depuis Volkmann, la discussion est donc très ouverte, lorsque en 1929, von Meyenburg fait une mise au point de la question; il insiste sur la stricte limitation de la régénération à la zone de destruction musculaire et reprend la distinction établie par Volkmann, en modifiant ses conclusions; pour lui, les bandes cellulaires néoformées restent incluses dans les étuis sarcolemmaux qui leur servent

de guides, mais leur origine est sarcoplasmique, ce qui exclut l'interprétation de Waldeyer; à côté de ce processus qui rappelle les sarcolytes de Weber, von Meyenburg admet aussi le bourgeonnement selon Volkmann; certains bourgeons plurinucléés peuvent du reste s'isoler dans le mésenchyme ambiant pour former des fibres nouvelles; ces deux modalités de la régénération continue ne s'opposent nullement, l'une ou l'autre pouvant être réalisée suivant l'espèce, suivant l'âge de l'individu et suivant la lésion en cause. Le déroulement du processus dans le temps est aussi étudié: la multiplication des noyaux commence dès la 4^e heure; les rubans cellulaires et les bourgeons apparaissent du 2^e au 15^e jour; la striation des myofibrilles se voit dans la 3^e semaine. Cette chronologie varie beaucoup suivant les auteurs, suivant l'espèce étudiée et la nature de la lésion. C'est Volkmann, qui observe la régénération la plus étalée dans le temps: pour lui, le bourgeonnement dure jusqu'à la 8^e semaine; nous retiendrons l'ordre de grandeur de ce délai, à confronter avec nos propres observations.

Fishback (1932) essaie de varier, dans ses expériences, les modalités de l'agression. Quant à Pfuhl (1934-7), il se rallie complètement à la théorie de la régénération continue, en rejetant même l'existence des sarcolytes; toute la régénération musculaire se ramène à un bourgeonnement, et la distinction de Volkmann entre section et dégénérescence lui paraît sans objet, car toute section est suivie d'une dégénérescence cireuse sur un court segment des fibres interrompues. Si une nécrose localisée expérimentale est réalisée par injection de bleu trypan, la fixation de celui-ci par athrocytose dans les éléments mésenchymateux les distingue des éléments d'origine musculaire: on voit alors des histiocytes envahir d'abord les sarcolemmes de la zone dégénérative, qui vont servir de guides à des coulées plasmodiales; mais celles-ci proviennent exclusivement du bourgeonnement des portions intactes des fibres; le 6^e jour, on y voit déjà des myofibrilles striées; au 69^e jour, la régénération est complètement achevée, et les fibres néoformées ne peuvent plus être distinguées. L'auteur observe, sans pouvoir les interpréter, des particules de bleu trypan, qui persistent longtemps, dans les fibres jeunes; or cette utilisation discriminative du bleu trypan apparaît aujourd'hui bien sujette à caution, vu nos connaissances sur la transformation histiocyttaire des fibres striées. Si la méthode expérimentale employée n'a plus, par conséquent, la valeur démonstrative voulue par son auteur pour ruiner définitivement la théorie de la régénération discontinue de Waldeyer, que l'on pourrait appeler encore: 'néogénèse mésenchymateuse', il n'en reste pas moins que les minutieuses descriptions de Pfuhl montrent un processus de bourgeonnement évidemment responsable de la régénération. Dès lors, du reste, il semble que le terme de bourgeonnement devienne superposable à celui de régénération continue, et puisse s'appliquer aux deux modalités de celle-ci, que distinguait encore von Meyenburg. Mais ce processus intervient-il toujours seul, comme l'ont voulu Weber, Volkmann, von Meyenburg, Pfuhl? C'est la question qui va se trouver posée de nouveau à partir des travaux de Levander (1941).

Il semble que, pendant près de 75 ans, l'évolution de cette question ait été dominée, en général implicitement, par la position dogmatique des auteurs admettant l'origine exclusive de la musculature striée, au cours du développement normal, à partir des myotomes. Levander rappelle que cette notion n'est nullement absolue, que les muscles des extrémités et certaines musculatures striées viscérales dérivent d'une différenciation *in situ* du mésenchyme; c'est ce que McGill (1910) avait déjà décrit, précisément pour la musculature striée œsophagienne du Porc. Rien ne s'opposerait donc *a priori* à ce que des éléments mésenchymateux puissent se transformer en fibres musculaires au cours d'un processus régénératif. Levander décrit cette néogénèse de fibres striées en plein conjonctif, après la nécrose musculaire déterminée dans les membres postérieurs du Lapin par l'alcool à 40°; le même phénomène est observé au voisinage d'implants musculaires dans l'hypoderme; l'absence de bourgeonnement continu est démontrée par des coupes sériées, et l'auteur constate au contraire la continuité des jeunes fibres néoformées avec les éléments conjonctifs voisins. Ainsi s'expliquerait l'observation de Pfuhl: si des fibres musculaires jeunes, régénérées, contiennent des particules de bleu trypan, c'est qu'il s'agit de cellules mésenchymateuses en cours de différenciation, qui ont partiellement conservé encore leur aptitude colloïdopexique. A l'appui des vues de Levander, viennent s'inscrire les expériences de Lecamp (1947, 1948) sur la régénération des membres chez les Amphibiens: le tissu de régénération, où vont se former des fibres musculaires, contient exclusivement des cellules mésenchymateuses, et toute continuité avec des fibres saines persistantes est ici aussi exclue. On sait toutefois combien il est hasardeux de transposer d'un groupe animal à l'autre (surtout aussi éloigné) des observations sur les phénomènes de régénération.

Cette façon de voir n'est pas adoptée en général actuellement. Le Gros Clark et al. (1945, 1946, 1947) décrit le bourgeonnement, et la réhabitation des sarcolemmes, après nécrose ischémique: pour lui, le bourgeonnement intervient seul, et s'effectue aux dépens des fibres saines environnantes et des fibres qui ont survécu au sein de la lésion. Des bourgeons sarcoplasmiques se voient dès le 3^e jour, et à la 2^e semaine les fibres régénérées sont en place, si la lésion n'a pas été trop étendue. Quoique formées par bourgeonnement, les fibres régénérées ont l'aspect de myoblastes embryonnaires. Dans les conditions favorables réalisées par ses expériences (conservation intégrale de la charpente conjonctive), Clark peut mesurer la vitesse de croissance des bourgeons, qui est très grande: 1,2 à 1,7 mm. par jour pendant les 14 premiers jours. Il critique donc les observations de Levander, et considère que les aspects de myoblastes isolés correspondent à des coupes obliques de longs rubans continus, rattachés à des fibres pré-existantes voisines ou même assez éloignées; il retient ce bourgeonnement comme seul responsable de toute régénération musculaire. C'est le point de vue admis récemment par Adams, Brown, & Pearson (1954).

Si l'on considère les observations de Clark comme devant réfuter l'opinion de Levander, on est conduit aux deux remarques suivantes:

1. Si l'on se place au point de vue de Clark, que l'on admet avec lui que dans les expériences de Levander il est resté des fibres musculaires partiellement ou totalement intactes au sein de la lésion destructive, et que celles-ci sont responsables d'une régénération par bourgeonnement, ses expériences d'ischémie réalisent des conditions identiques et fournissent un objet d'observation adéquat pour une telle réfutation;
2. mais si l'on se place au point de vue de Levander, qui dans ses lésions destructives et dans ses expériences d'autogreffe admet la disparition totale des fibres pré-existantes, l'observation de Clark, dans une lésion où des fibres persistent, rejoint simplement celles de Pfuhl et n'est pas complètement démonstrative.

Il serait donc *a priori* préférable, pour départager ces deux opinions opposées, d'observer ce qui se passe dans un tissu conjonctif certainement dépourvu de restes de fibres striées, mais en contact avec la tranche de section d'une plaie musculaire. C'est précisément dans ces conditions qu'ont été faites les observations qui vont suivre.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nos documents proviennent de la vérification histologique d'une série d'interventions, faites chez le Chien dans le Laboratoire de Chirurgie Expérimentale du Pr. de Vernejoul.¹

Une perte de substance est créée sur l'œsophage thoracique, par exérèse d'un volet d'au moins 2 x 2 cm., intéressant toute l'épaisseur de la paroi de l'organe. Les lèvres de la plaie ne sont pas rapprochées, et la brèche est simplement obturée par un lambeau de péricarde pariétal, suturé au fil de nylon à l'adventice œsophagienne. Le lambeau péricardique est prélevé extemporanément sur l'animal lui-même, ou prélevé préalablement sur un autre individu et conservé.

Dans quelques cas, au lieu d'une perte de substance latérale, il a été fait une résection segmentaire, sans suture bout-à-bout, suivie encore de la mise en place d'une plastie 'en fourreau' au moyen d'un lambeau péricardique.

Nous n'incluons pas, dans cette série expérimentale homogène, quelques cas où des pertes de substance avaient été suivies de plastie par un lambeau pleural, avec des résultats chirurgicaux moins bons et souvent une cicatrisation fibreuse de la musculature œsophagienne; lorsqu'une régénération était observée, elle s'effectuait de la même façon que dans les cas décrits ci-dessus. La question de cette différence de comportement de la musculature striée œsophagienne, au contact d'un greffon pleural et d'un greffon péricardique, n'est pas discutée ici; elle devrait du reste être établie sur des documents plus nombreux.

La description qui suit est basée sur l'examen de l'œsophage de 19 chiens adultes opérés depuis un délai variant de 6 heures à 10 mois. Fixation au Bouin; colorations: hémalum-éosine, trichrome de Masson ou de Masson-Goldner;

¹ L'exposé détaillé de ces expériences, du point de vue chirurgical, se trouve dans la thèse d'Inglesakis (Marseille, 1955): 'Utilisation des Séreuses Intra-Thoraciques comme matériel de plastie en chirurgie œsophagienne', et fera l'objet d'un mémoire séparé.

éventuellement coloration des fibres élastiques par la fuchsine-résorcine de Weigert ou l'orcéine.

RÉSULTATS

Les suites immédiates de l'intervention sont caractérisées par une réaction inflammatoire intense au contact de la cavité œsophagienne septique; l'envahissement leucocytaire respecte le greffon, dont la destinée est difficile à préciser et ne nous intéresse pas ici; il se forme rapidement dans la brèche un massif de tissu de granulation, en dehors duquel se distinguent parfois longtemps encore les plans fibreux du feuillet péricardique.

Après le 6^e jour, l'afflux leucocytaire diminue, et fait place peu à peu à la prolifération fibroblastique; de petits foyers inflammatoires peuvent encore persister au 28^e jour; mais dans l'ensemble il s'est très précocement constitué un massif conjonctif qui a comblé la perte de substance et a été recouvert par l'épithélium, régénéré concentriquement à partir des bords de la plaie; en somme, une cicatrisation banale, avec une épithélialisation qui est réalisée avant le 15^e jour; la reconstitution de la couche glandulaire et de la *muscularis mucosae* peut aller de pair, ou être un peu plus tardive.

Les phénomènes qui nous intéressent se produisent dans le massif conjonctif, plus ou moins inflammatoire dans les premiers jours, qui est délimité en dedans par le chorion de la muqueuse ou la *muscularis mucosae* lorsqu'elle s'est reconstituée, en dehors par l'adventice, éventuellement renforcée par ce qui persiste de la charpente fibreuse du greffon péricardique, enfin latéralement par les lèvres de la plaie musculaire largement éloignées l'une de l'autre. Dans ce massif conjonctif, il n'existe à l'origine aucun élément musculaire quelconque; or au bout de 7 jours, on y trouve un amas de fibres musculaires d'aspect plus ou moins embryonnaire et à myofibrilles lisses (Planche, Fig. A); ultérieurement, il s'y développera un tissu musculaire strié raccordé aux lèvres de la plaie, et la continuité de la tunique musculaire se rétablira de façon parfaite. C'est ce processus, qu'il faut analyser dans ses stades initiaux.

En réalité, l'apparence du phénomène est moins simple, car inflammation, prolifération conjonctive, dégénérescence et régénération musculaire s'intriquent dans le temps et dans l'espace. Ainsi des segments de fibres atteints de dégénérescence cireuse se voient immédiatement en bordure de la perte de substance pendant les tout premiers jours; mais on en voit dès le 2^e jour en deçà des lèvres de la plaie, et pendant les semaines ou les mois que durera la reconstruction de la tunique musculaire, on verra souvent encore des lésions dégénératives frappant des fibres isolées ou des groupes de fibres, dans des territoires intacts par ailleurs (Planche, Fig. B). D'autre part l'intensité et la durée de la réaction inflammatoire (envahissement leucocytaire, prolifération fibroblastique et capillaire) varient beaucoup d'une expérience à l'autre; fait remarquable: il semble que cet état inflammatoire ne s'oppose nullement à la régénération musculaire, qui peut se faire rapidement au sein d'un véritable granulome.

Le début de la régénération est très précoce: au 2^e jour, en plein foyer inflammatoire, dans le tissu de granulation formé par l'hôte en dedans du feuillet péricardique transplanté, on voit quelques rares bourgeons musculaires renflés en massue et afibrillaires, à l'extrémité sectionnée des fibres du bord de la plaie; au 6^e jour, ces bourgeons renflés prolongeant les fibres saines sont très nombreux (Planche, Fig. C); ce sont des masses sarcoplasmiques trapues, claires, finement granuleuses, renfermant des groupes de noyaux et dépourvues de myofibrilles dans leur partie distale; ce sont là de classiques bourgeons d'aspect myoblastique, correspondant aux descriptions de Volkmann, de von Meyenburg.

Mais à la fin de la 1^{ère} semaine, se voit en même temps un autre aspect: au milieu du tissu conjonctif qui a bouché la perte de substance, existe un massif assez compact formé d'étroites fibres enchevêtrées, ou de cellules fusiformes dont on hésite parfois à décider si ce sont des fibroblastes ou des éléments musculaires (Planche, Fig. D). En réalité, leur colorabilité un peu plus intense par la fuchsine, et la présence indubitable de fibrilles non striées visibles en contraste de phase, les identifient comme des éléments musculaires peu différenciés. On a donc là l'impression d'un massif de fibres néoformées à partir de fibroblastes, en plein conjonctif, comme dans les expériences de Levander. On voit exceptionnellement des mitoses dans ces éléments.

Toutefois on trouve toujours des segments de rubans musculaires semblables, entre ce massif principal et les lèvres de la plaie musculaire (Planche, Fig. E); enfin en cherchant minutieusement, on parvient à trouver de minces rubans pourvus de fibrilles et renfermant de place en place des noyaux, qui s'étendent sans interruption depuis les fibres musculaires intactes du bord de la plaie, jusqu'à la partie centrale de la perte de substance. Ce sont des rubans sarcoplasmiques minces (ne dépassant parfois pas 5 μ de diamètre), de calibre un peu irrégulier, rectilignes ou peu flexueux, dont les fibrilles peu nombreuses restent dépourvues de striation sur toute leur longueur. L'identification de ces éléments a été facilitée par l'observation en contraste de phase coloré variable, de coupes colorées ou non colorées.

Bientôt les fibres qui ont ainsi progressé à la rencontre les unes des autres, jusqu'à s'enchevêtrer au centre de la plaie, augmentent de calibre; la striation transversale n'apparaît que vers le 15^e jour. L'accroissement de taille et l'acquisition des caractères définitifs de fibres striées différenciées, assurent, dans les semaines qui suivent, la constitution d'une couche musculaire peu épaisse et mal organisée, qui cependant établit la continuité de la tunique contractile œsophagienne.

Mais les choses n'en restent pas là, et on voit le processus de bourgeonnement se prolonger pendant plusieurs mois, surtout ou presque exclusivement à la face externe de la musculature reconstituée. Au 226^e jour, on voit encore, immédiatement sous l'adventice, des fibres émettant de gros bourgeons trapus, parfois renflés en massue, présentant alors, comme les premiers bourgeons apparus après le traumatisme, l'aspect de larges et courts rubans plasmodiaux; les

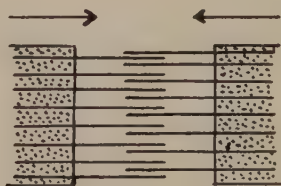
myofibrilles striées se voient à peu de distance de l'extrémité (Planche, Fig. F). Il y a là aussi quelques fibres striées très minces, avec parfois des noyaux axiaux, sans doute régénérées depuis peu (Planche, Fig. G).

Il est à noter que dans les pièces examinées tardivement (6 à 7 mois), des phénomènes de bourgeonnement et aussi de dégénérescence se voient en particulier au voisinage des fils de suture; ceux-ci sont restés en place, mais envahis et dissociés par une prolifération conjonctive granulomateuse qui a éventuellement évolué vers la sclérose.

Quoi qu'il en soit, au voisinage ou à distance des fils de suture, des phénomènes de remaniement et de régénération active du tissu musculaire strié se manifestent encore 7 mois et demi après l'intervention.

DISCUSSION

Le résultat le plus important de ces expériences concerne le processus de régénération précoce du tissu musculaire strié. L'examen des pièces prélevées pendant les premiers jours après l'intervention peut donner l'impression que deux phénomènes entrent en jeu: d'une part le bourgeonnement évident des fibres sectionnées, et d'autre part la formation de tissu musculaire nouveau *in situ*, dans le massif conjonctif qui a comblé hâtivement la perte de substance. En faveur de l'existence de ce deuxième processus, plaide la présence d'une masse de tissu musculaire peu différencié dans la partie centrale de ce massif conjonctif, dès le 7^e jour après l'intervention; les images cytologiques, d'autre part, quoique d'interprétation difficile, peuvent être suggestives d'une différenciation musculaire *in situ* de fibroblastes. En réalité, cette interprétation ne résiste pas à la critique.



TEXTE-FIG. 1

En effet nous avons vu que l'on peut suivre des fibres très minces, pourvues de myofibrilles homogènes, étendues du bord jusqu'au centre du massif conjonctif; il s'agirait là d'un phénomène nécessairement rapide, dont nous verrons que la vitesse est parfaitement concevable; cette poussée proliférative se faisant à partir de tout le pourtour de la perte de substance, il existe un court laps de temps pendant lequel les extrémités des rubans musculaires s'entrecroisent au centre de celle-ci: c'est pourquoi, au bout de la première semaine, la densité du tissu musculaire nouveau, en ce point, peut donner l'impression que c'est là le point

de départ de la prolifération; le schéma ci-contre (Texte-fig. 1) rend compte de cette fausse apparence.

La question se pose de savoir si les fibres régénérées de part et d'autre restent effectivement entrecroisées, ou s'il se fait des anastomoses bout-à-bout; resté en suspens après les travaux de Clark, ce point a été examiné par Gay & Hunt (1954), qui concluent qu'après section musculaire, la majorité des fibres régénérées par bourgeonnement se raccordent bout-à-bout, rétablissant ainsi la continuité non seulement du tissu musculaire, mais même de chacun de ses éléments constitutifs.

Quoi qu'il en soit, cette explication suppose que l'on puisse admettre comme plausible la rapidité du processus de progression des 'pousses' musculaires. La perte de substance initiale est d'environ 2 cm. de côté; pour des raisons diverses qu'il est inutile de discuter ici, il se produit dans les premiers jours une légère rétraction; de sorte que la distance du bord de la plaie à son centre n'est plus que de 1 cm. environ, ou inférieure à 1 cm.; or Clark (1946) a montré que la croissance des fibres striées régénérées par bourgeonnement était, dans ses expériences, de 1.2 à 1.7 mm. en moyenne, par jour, pendant les 2 premières semaines: c'est exactement l'ordre de grandeur résultant de notre observation.

Il est du reste intéressant de constater cette coïncidence, dans deux cas où la régénération se fait dans des conditions d'environnement très différentes, à savoir: dans une charpente conjonctive et sarcolemmale restée intacte et fournissant les trajets préformés du cheminement des bourgeons musculaires (expériences d'ischémie de Clark), et dans un tissu conjonctif jeune ressemblant souvent à un véritable granulome inflammatoire (nos expériences de perte de substance chirurgicale). On peut du reste fort bien concevoir que ce tissu de granulation fournisse un milieu favorable à la croissance des jeunes fibres, puisque son armature fibrillaire réduite oppose peu d'obstacles mécaniques, et que l'intense vascularisation permet des échanges métaboliques actifs. Ces deux types d'expérience fournissent peut-être, par des moyens très différents, des conditions particulièrement favorables à cette croissance. Ce rapprochement suggère même que l'on puisse favoriser la réparation d'une perte de substance musculaire, par tout moyen qui provoquerait la production d'un tissu de granulation. On peut remarquer à cet égard que dans l'expérience de transplantation de Levander, les fibres néoformées apparaissent précisément dans un tissu de granulation développé par l'hôte autour de l'implant. Nous inclinierions volontiers à penser, avec Clark, que ces fibres nouvelles sont des rubans musculaires formés par bourgeonnement des fibres transplantées; l'argument opposé d'avance par Levander à cette façon de voir, basé sur l'examen de coupes en série, ne nous semble pas absolument convaincant: en effet, dans nos expériences, nous avons vu ces rubans, pendant leur rapide croissance en longueur, présenter des irrégularités de calibre, des rétrécissements qui les rendent si ténus, que l'on peut sans doute difficilement affirmer leur absence sur des coupes sériees un tant soit peu obliques. La constatation de rares images de rubans continus, dans des coupes d'orientation

favorable, nous paraît plus démonstrative en faveur de notre interprétation, que l'impossibilité de les mettre en évidence sur coupes sériees ne l'est en faveur de l'interprétation de Levander. Par ailleurs, Levander assiste à la dégénérescence totale du muscle implanté: on peut admettre que la vigueur avec laquelle nous avons vu que pouvait se produire le bourgeonnement, immédiatement après la section, permet la formation de rubans musculaires déjà fortement installés dans le conjonctif ambiant, et capables de s'y développer désormais malgré la dégénérescence des fibres différenciées; Clark met du reste en doute cette dégénérescence totale. Il se produirait là un phénomène comparable à ce qui se voit dans la zone marginale d'un explant *in vitro*, et l'expérience de Levander serait en somme une autogreffe réussie.

Ainsi la capacité régénérative du tissu musculaire strié, loin d'être nulle ou très faible en regard de celle d'autres tissus, nous apparaît aujourd'hui au contraire comme très considérable. Sans doute se manifeste-t-elle peu, notamment dans les conditions pathologiques, en raison du milieu dans lequel elle est amenée à se produire; mais des conditions favorables la révèlent comme une propriété fondamentale, inhérente à la fibre striée considérée en elle-même.

Nous pensons donc pouvoir admettre que, dans nos expériences, le bourgeonnement intervient seul pour assurer la régénération. Mais elles montrent aussi que ce bourgeonnement peut se faire selon deux modalités très différentes: d'une part le bourgeonnement classique, en plasmodes larges et relativement courts; d'autre part le bourgeonnement en minces rubans à croissance distale extrêmement rapide. Dans un cas comme dans l'autre, la fibrillogénèse est précoce, mais l'apparition de la striation transversale est tardive: de sorte que dans les larges bourgeons du premier type, à croissance relativement lente, la striation se voit à peu de distance de l'extrémité, tandis que les rubans à croissance rapide peuvent ne présenter des myofibrilles striées, qu'à plusieurs millimètres de celle-ci.

Le deuxième point, qu'il convient de discuter ici, est la persistance très longue de phénomènes de bourgeonnement après une perte de substance œsophagienne. Les deux auteurs qui ont observé les durées de bourgeonnement régénératif les plus longues sont Volkmann (8 semaines) et Pfuhl (10 semaines); or nous l'avons vu encore manifeste au bout de 7 mois et demi, sous la forme de larges bourgeons plasmodiaux. Cet étalement du phénomène dans le temps nous paraît intéressant à noter, car il semble conditionner ici la réfection d'une paroi œsophagienne sensiblement normale, par apposition tardive de fibres nouvelles dans le plan de la tunique externe.

La question peut se poser de savoir si ce phénomène tardif correspond bien à un perfectionnement morphogénétique, ou s'il faut l'attribuer seulement à la présence du matériel de suture non résorbable; il se peut que les fils de nylon soient la cause de micro-traumatismes répétés, dont les conséquences seraient des dégénérescences parcellaires, suivies de régénérations réparatrices n'ayant rien à voir avec le comblement de la perte de substance initiale; nous avons déjà

noté la prédilection de ces bourgeonnements tardifs pour les zones de suture; la question ne pourrait être tranchée que par des observations plus prolongées encore.

Il reste à envisager les raisons pour lesquelles nous observons, dans le cas envisagé, une régénération musculaire aussi précoce et aussi parfaite. Il se peut que le mode opératoire joue un rôle à cet égard: on peut penser que la perte de substance chirurgicale suivie de plastie favorise au mieux la constitution d'un tissu de granulation, qui serait lui-même, pour les jeunes fibres en croissance, un milieu éminemment favorable. Mais nous avons dit que la nature du matériel de plastie utilisé paraissait avoir aussi une influence, puisque l'obturation de la plaie avec un greffon péricardique donne de meilleurs résultats histologiques, et évite la cicatrisation fibreuse de la musculature beaucoup plus sûrement qu'avec un greffon pleural. Mais la nature de ces facteurs favorisants, liés à l'intervention, n'apparaît pas clairement.

Il se peut aussi que le cas envisagé soit favorable parce qu'il s'agit de l'œsophage, donc d'une musculature striée viscérale.

Les fibres striées qui la constituent ont vraisemblablement, en elles-mêmes, un comportement identique à celui des fibres d'un muscle squelettique; du reste la régénération rapide observée par Clark et celle qui suit la transplantation, dans l'expérience de Levander (interprétée dans ce sens selon Clark et selon nous-mêmes), concernent des muscles squelettiques.

On peut se demander si le bourgeonnement tardif ne serait pas lié à l'innervation particulière des fibres œsophagiennes, qui est une innervation végétative; nous avons été frappés de rencontrer dans trois cas (une plastie pleurale et deux plasties péricardiques) un gros ganglion manifestement néoformé, dans la zone de la perte de substance; ce sont des faits isolés, suggestifs, mais qui ne fournissent pas une explication.

Enfin on peut envisager le rôle d'une stimulation mécanique. Dans les expériences classiques de section, de brûlure, de destructions par caustiques ou par divers agents cytotoxiques, affectant des muscles volontaires, il y a toujours pendant la période de réparation une immobilisation réflexe, ou volontaire, ou imposée, du muscle lésé. Il est possible que cette immobilisation se fasse de façon moins absolue dans l'expérience de simple ischémie de Clark; mais en tous cas, dans nos expériences, le tissu où se fait la régénération participe aux mouvements de l'ensemble de l'œsophage, puisque les animaux se réalimentent très rapidement après l'intervention. Il n'est pas impossible que ce facteur morphogénétique, dont le rôle est si évident dans d'autres domaines, intervienne ici aussi.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

1. Lorsque une perte de substance est réalisée chirurgicalement sur l'œsophage thoracique du Chien, et comblée par un greffon péricardique suturé à

l'adventice sans rapprochement des lèvres de la plaie, on assiste à la reconstitution très rapide de la tunique musculaire striée.

2. Cette reconstitution se fait par un processus de régénération procédant exclusivement par bourgeonnement, donnant d'abord naissance à de minces rubans musculaires peu différenciés, à croissance longitudinale très rapide. Ces observations, concernant un territoire conjonctif où l'on peut affirmer l'absence de fibres musculaires ou de fragments de fibres pré-existantes, tendent à refuser toute réalité au processus de régénération dite 'discontinue', à la néogénèse de fibres nouvelles par différenciation d'éléments mésenchymateux. Au contraire, elles viennent à l'appui de l'opinion de Pfuhl, de Clark, d'Adams, Brown, & Pearson, selon laquelle la régénération du tissu musculaire strié, chez les mammifères, se fait exclusivement selon le mode 'continu' du bourgeonnement.

3. Dans nos expériences, outre la régénération précoce qui rétablit la continuité musculaire, on assiste à un bourgeonnement régénératif tardif (jusqu'à 7 mois et demi). Nous ne pouvons pas nous prononcer sur la signification de celui-ci: soit conséquence de micro-traumatismes dûs aux fils de suture, soit achèvement très lent d'une reconstitution anatomiquement et fonctionnellement parfaite de la tunique musculaire de l'organe.

SUMMARY

1. When part of the dog's thoracic œsophagus is surgically removed, and the defect is covered by a graft of pericardium, sutured to the adventitia without drawing together the edges of the wound, there occurs a very rapid reconstitution of the striated muscle tunic.

2. The regeneration involved in this reconstitution occurs exclusively by a process of outgrowth, which initially gives rise to thin strands of little differentiated muscle, growing rapidly in length. These observations, made on the region of junction which can confidently be declared to be free from pre-existing muscle-fibres or fragments of muscle-fibres, throw doubt on the existence of the mode of regeneration called 'discontinuous', particularly on muscle-fibre neogenesis by differentiation of mesenchyme *in situ*. On the contrary, they support the opinion of Pfuhl, of Clark, and of Adams, Brown, & Pearson, that regeneration of mammalian striped muscle occurs exclusively by 'continuous' outgrowth.

3. In these experiments, besides the immediate regeneration which re-establishes muscular continuity, there is a delayed outgrowth (lasting up to 7½ months). We do not know the significance of this: it may be the consequence of continuous micro-trauma from the sutures, or it may be a very slow perfection of the anatomical and functional reconstitution of the muscular tunic.

TRAVAUX CITÉS

- ADAMS, R. D., BROWN, D. D., & PEARSON, C. M. (1954). *Diseases of muscle*. New York: Hoeber-Harper.
- CLARK, W. E. LE GROS (1946). An experimental study of the regeneration of mammalian striped muscle. *J. Anat., Lond.* **80**, 24-36.

- & BLOMFIELD, L. B. (1945). The efficiency of intramuscular anastomoses, with observation of the regeneration of devascularized muscle. *J. Anat., Lond.* **79**, 15–32.
- & WAJDA, H. S. (1947). The growth and maturation of regenerating striated muscle fibres. *J. Anat., Lond.* **81**, 56–63.
- CHÈVREMONT, M. (1942). Recherches sur l'origine, la distribution, les caractères cytologiques et les propriétés biologiques des histiocytes et des macrophages par la méthode des cultures de tissus. *Archives de Biologie, Liège et Paris*, **53**, 281–485.
- & CHÈVREMONT-COMHAIRE, S. (1945). Recherches sur le déterminisme de la transformation histiocyttaire. *Acta Anat.* **1**, 94–142.
- FISHBACK, D. K., & FISHBACK, H. R. (1932). Studies of experimental muscle degeneration. II. Standard method of causation of degeneration and repair of the injured muscle. *Amer. J. Path.* **8**, 211–17.
- FORBUS, W. D. (1926). Pathologic changes in voluntary muscles. I. Degeneration and regeneration of the rectus abdominis in pneumonia. II. Experimental study of degeneration and regeneration of striated muscle with vital stain. *Arch. Path. Lab. Med.* **2**, 318–39, 486–99.
- GAY, A. J., & HUNT, I. E. (1954). Reuniting of skeletal muscle fibres after transection. *Anat. Rec.* **120**, 853–71.
- GIORGI, P. DE, & GUYÉNOT, E. (1923). Les potentialités des régénérats: croissance et différenciation. *C.R. Soc. Biol., Paris*, **89**, 488.
- GODLEWSKI, E. (1902). Die Entwicklung des Skelet und Hertzmuskelgewebes der Säugethiere. *Arch. mikr. Anat.* **60**, 111–56.
- GUSSENBAUER, C. (1871). Über die Veränderungen des quergestreiften Muskelgewebes bei der traumatischen Entzündung. *Arch. klin. Chir.* **12**, 1011–47.
- GUYÉNOT, E. (1930). Territoires de régénération et transplantation. *Bull. biol.* **64**, 251.
- HEIDENHAIN, M. (1913). Über die Entstehung der quergestreiften Muskelsubstanz bei der Forelle. *Arch. mikr. Anat.* **83**, 427–47.
- KRASKE, P. (1878). *Experimentelle Untersuchungen über die Regeneration der quergestreiften Muskeln*. Halle: M. Niemeyer. Cité par Adams, Brown, & Pearson (1954).
- LANGLEY, J. N. (1917). Observations of denervated and regenerating muscle. *J. Physiol.* **51**, 377–95.
- LECAMP, M. (1947). Recherche du glycogène dans les tissus de régénération chez les Batraciens. *C.R. Acad. Sci., Paris*, **224**, 230–1.
- (1948). Régénération chez le Triton *in vitro* et *in vivo*. *C.R. Acad. Sci., Paris*, **226**, 695–6.
- LEVANDER, G. (1941). Über die Regeneration der quergestreiften Muskulatur. *Arch. klin. Chir.* **202**, 677–92.
- MCGILL, C. (1910). The early histogenesis of striated muscle in the œsophagus of the pig and the dogfish. *Anat. Rec.* **4**, 23–47.
- MARTIN, B. (1919). Regeneration quergestreiften Muskeln. *Arch. klin. Chir.* **111**, 673–84.
- MEYENBURG, H. VON (1929). Die quergestreifte Muskulatur. 12. Regeneration. In Henke u. Lubarsch: *Handb. der spez. path. Anat. u. Histol.* **9/1**; 336 sq. Berlin: Springer.
- NAVILLE, A. (1922). Histogénèse et régénération du muscle chez les Anoures. *Archives de Biologie, Liège et Paris*, **32**, 37–171.
- PFUHL, W. (1937). Die Regeneration der quergestreiften Muskelfasern nach wachsender Degeneration. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **41**, 569–616.
- PIELSTICKER (1909), SCHMINCKE, A. (1907–8–9), STEMMMLER, W. (1914), THOMA, R. (1906–9–10): cités par PFUHL, W. (1937).
- THOMAS, J. A. (1934). La transformation *in vitro* de la cellule entoblasto-vitelline en macrophage. *C.R. Soc. Biol., Paris*, **117**, 758–60.
- VOLKMANN, R. (1893). Über die Regeneration des quergestreiften Muskelgewebes beim Menschen und Säugetier. *Beitr. path. Anat.* **12**, 233–324.
- WALDEYER, W. (1865). Über die Veränderungen der quergestreiften Muskeln bei der Entzündung und dem Typhus Prozess, sowie über die Regeneration derselben nach Substanz Defekten. *Virchow's Arch.* **34**, 473–514.
- WEBER, O. (1867). Über die Neubildung quergestreifter Muskelfasern, insbesondere die regenerative Neubildung derselben nach Verletzungen. *Virchows Arch.* **39**, 216–53.

EXPLICATION DE LA PLANCHE

FIG. A. 7^e jour. Fibres jeunes dans le massif conjonctif cicatriciel.

FIG. B. 15^e jour. Bourgeonnement des lèvres de la plaie. On remarquera une fibre très sombre, dégénérée, parmi les bourgeons musculaires.

FIG. C. 6^e jour. Dans le prolongement des fibres saines, se voient de nombreux bourgeons.

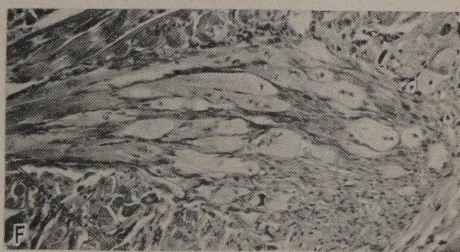
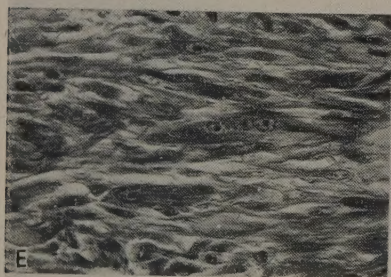
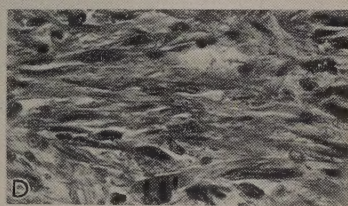
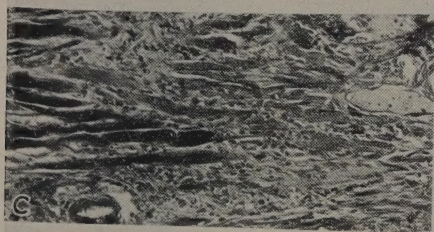
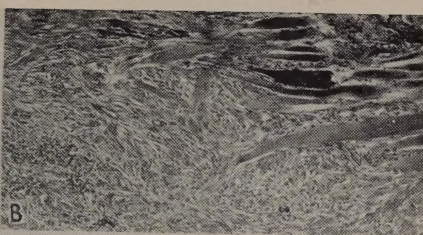
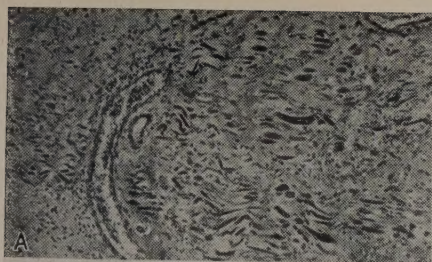
FIG. D. 15^e jour. Enchevêtrement d'éléments fusiformes, fibroblastes et fragments de rubans musculaires.

FIG. E. 15^e jour. Cheminement des éléments musculaires jeunes dans le tissu conjonctif.

FIG. F. 224^e jour. Bourgeons en forme de massue, régénération tardive.

FIG. G. 224^e jour. Fibres minces et rubans plasmodiaux dans une musculature régénérée.

(Manuscript received 18:xii:55)



D. PICARD, E. HENRY, G. COTTE, & J. A. INGLESAKIS

INSTRUCTIONS FOR CONTRIBUTORS

Contributions and correspondence about them should be sent to Mr. M. Abercrombie, Department of Anatomy and Embryology, University College, Gower Street, London, W.C.1, England.

Contributions should be as concise as possible. They should be typewritten, double-spaced, on one side of the paper, the pages numbered. They should be fully ready for press, since revision in proof will not be possible. Footnotes should be avoided. The author is advised to keep a copy of the typescript.

Tables should be on separate sheets, and numbered. Authors should indicate the places for their insertion in the margin of the typescript.

The Summary should be in numbered paragraphs, and will be put at the end of the text. It should not exceed 500 words.

Acknowledgements should be placed immediately before the list of references.

References should be listed alphabetically. In the text they should be referred to by the author's name and the year of publication. If more than one reference to the same author and year is quoted, use suffixes *a*, *b*, &c. (e.g. 1951*a*) in text and reference list. Papers should be listed as follows: Surname followed by initials of author(s); year of publication; title of paper; name of Journal (World List of Scientific Periodicals abbreviation), underlined; volume number; first and last page: e.g. Spemann, H., & Mangold, H. (1924). Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Arch. mikr. Anat.* **100**, 599-683. Books should be listed as follows: Surname followed by initials of author(s); year of publication; title underlined; place of publication; publisher: e.g. Dalcq, A. (1941). *L'Œuf et son dynamisme organisateur*. Paris: Albin Michel.

Illustrations. Line drawings should be used wherever possible, in preference to illustrations requiring half-tone reproduction. In general their size should be such that they are reduced for publication to approximately two-thirds linearly. When reduced, no illustration together with its lettering should exceed five inches in width, and, if it is to occupy a whole page, seven and a half inches in length. Name of author and figure number should be written on

the back, together with the proposed reduction in size. Magnification should be indicated by a scale-line drawn in Indian ink on or beside all drawings and photographs.

Black and white line or line and dot drawings should have all lettering or numerals put in lightly in block capitals with a soft pencil. Charts and graphs may be drawn in Indian ink on graph paper ruled in pale blue. Where several drawings are grouped as one figure, distinguish them by capital letters (in pencil). Legends for all line drawings should be typed together on a separate sheet. The places for insertion in the text should be indicated in the margin of the typescript. The drawings should be referred to in the text as 'Text-fig. 1', etc.

Half-tone illustrations (photographs or drawings other than black and white) will be limited in number; authors may be asked to provide a grant for an excessive number. If fine detail is not required they can be reproduced amongst the text (please indicate position), in which case they should be numbered in series with the line drawings, if any. If fine detail is required, they will be on a separate plate. The legends should then be typed on a separate sheet, headed 'Explanation of Plate(s)', and the illustrations should be referred to in the text as 'Plate 1, fig. A', &c. Leader lines should be drawn in Indian ink. All letters or numerals which are to go on the illustration, should be in pencil (block capitals) on a covering sheet of transparent paper. Lettering or numerals to go at the side should be written there in pencil (block capitals); photographs, for this purpose, should be mounted on card. If the author wishes the block-maker to pay special attention to reproducing any part of an illustration, he should indicate this on the transparent paper. Photographs should be glossy bromide prints.

Proofs. Authors will receive one set of proofs for correction and return to the Editor. Authors may be required to pay for an excessive number of alterations in proof, apart from printer's errors.

Reprints. Authors will receive fifty free reprints. Additional copies may be ordered for purchase when proofs are returned to the Editor.

Journal of Embryology and Experimental Morphology

[J. Embryol. exp. Morph.]

VOLUME 4

September 1956

PART 3

Contents

NEW, D. A. T. The Formation of Sub-blastodermic Fluid in Hens' Eggs	221
SHATOURY, H. H. el Developmental Interactions in the Development of the Imaginal Muscles of <i>Drosophila</i> <i>With 3 plates</i>	228
SHATOURY, H. H. el Differentiation and Metamorphosis of the Imaginal Optic Glomeruli in <i>Drosophila</i> <i>With 2 plates</i>	240
SIRLIN, J. L., BRAHMA, S. K., and WADDINGTON, C. H. Studies on Embryonic Induction using Radioactive Tracers <i>With 1 plate</i>	248
O'RAHILLY, R., GARDNER, E., and GRAY, D. J. The Ectodermal Thickening and Ridge in the Limbs of Staged Human Embryos <i>With 2 plates</i>	254
LALLIER, R. Les ions de métaux lourds et le problème de la détermination embryonnaire chez les Échinodermes	265
LIÉBECQ-HUTTER, SUZANNE Action de la 'dicarnitine' sur la croissance et l'ossification d'ébauches de tibias et de fémurs d'embryons de poulet cultivés <i>in vitro</i> <i>Avec 1 planche</i>	279
PICARD, D., HENRY, E., COTTE, G., et INGLESAKIS, J. A. Régénération du tissu musculaire strié dans des pertes de substance expérimentales de l'œsophage chez le chien <i>Avec 1 planche</i>	299